

Aus dem  
Deutschen Herzzentrum München der  
I. Medizinischen Klinik der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Schömig)  
und dem  
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung  
der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Gansbacher)

Angefertigt  
unter Leitung von PD Dr. med. D. Zohlnhöfer

Vorgelegt über den Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie  
des Instituts für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians- Universität München  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)

**Die mTOR Aktivierung durch die CXCR3 Liganden IP10 und MIG als  
wichtiger Mechanismus in kardiovaskulären Erkrankungen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Johannes Bernhard Korbinian Schwarz  
aus  
Freising

München, 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Schmahl
Korreferenten:	Univ.-Prof. Dr. Kaspers Univ.-Prof. Dr. Dr. Erben Univ.-Prof. Dr. Poulsen Nautrup Univ.-Prof. Dr. Wolf

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

Meiner Familie

Marmelade und Himbeereis

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SCHRIFTTUM</b>	<b>3</b>
2.1	Aufbau von Arterien muskulären Typs.....	3
2.2	Atherosklerose.....	4
2.2.1	Pathophysiologie der Atherosklerose.....	4
2.2.2	Therapie der Atherosklerose.....	5
2.3	Restenose und Intimahyperplasie.....	7
2.3.1	Pathophysiologie der Restenose und Intimahyperplasie.....	7
2.3.2	Die Bedeutung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in der Pathophysiologie der Restenose und Intimahyperplasie.....	8
2.3.3	Die Bedeutung der Entzündungsreaktion in der Pathophysiologie der Restenose und Intimahyperplasie.....	9
2.3.4	Die Bedeutung der Th1-Immunantwort für Restenose und Intimahyperplasie.....	10
2.4	Die Bedeutung von Chemokinen in der Restenose und Intimahyperplasie.....	11
2.4.1	Die Rolle der CXCR3-IP10-MIG-Achse in der Gefäßverletzung.....	13
2.5.	Die Rolle von Sauerstoffradikalen und Apoptose in der Gefäßverletzung.....	15
2.5.1	Sauerstoffradikale und oxidativer Stress.....	15
2.5.2	Apoptoseinduktion in der Gefäßverletzung.....	16
2.6	Die Bedeutung von Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) für Restenose und Intimahyperplasie.....	17
2.6.1	Die Rolle von mTOR, mTORC1 und mTORC2 in der Gefäßverletzung.....	18
2.6.2	Die Rolle von Rapamycin in der Gefäßverletzung.....	19
2.7	Atherosklerose und verletzungsinduzierte Intimahyperplasie beim Tier.....	21

<b>3</b>	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>23</b>
3.1	Zielsetzung des Gesamtprojektes .....	23
3.2	Zielvorstellung und Aufbau der eigenen Studie .....	23
3.3	Material und Methoden .....	25
3.3.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....	25
3.3.2	Versuchsplanung und Gruppeneinteilung .....	26
3.3.2.1	Effekt-Gruppe .....	26
3.3.2.2	Wildtyp- und CXCR3-Knockout-Gruppe .....	27
3.3.2.2.1	Wildtyp-Gruppe .....	27
3.3.2.2.2	CXCR3-Knockout-Gruppe .....	27
3.3.2.3	Placebo- und Antikörper-Gruppe .....	28
3.3.2.3.1	Placebo-Gruppe .....	28
3.3.2.3.2	Antikörper-Gruppe .....	28
3.3.3	Das Femoralisverletzungsmodell bei der Maus .....	29
3.3.3.1	Präoperative Versorgung .....	29
3.3.3.2	Anästhesie und Operationstechnik .....	29
3.3.3.3	Postoperative Versorgung .....	33
3.3.4	Euthanasie, Perfusion und Probengewinnung .....	34
3.3.5	Probenaufbereitung für histomorphometrische Analysen .....	34
3.3.5.1	Immersionsfixierung .....	34
3.3.5.2	Fixierung, Entwässerung und Vorparaffinierung .....	35
3.3.5.3	Einbettung in flüssiges Paraffin .....	35
3.3.5.4	Anfertigen von Paraffinschnitte .....	35
3.3.5.5	Färben der Paraffinschnitte .....	36
3.3.6	Histomorphometrische Analyse .....	36
3.3.7	Immunhistologische Analyse .....	38
3.3.7.1	Allgemeine Vorbehandlung der Schnitte .....	38
3.3.7.1.1	Entparaffinierung .....	38
3.3.7.1.2	Antigendemaskierung durch Hitzdenaturierung .....	38
3.3.7.1.3	Blockierung endogener Enzyme .....	39
3.3.7.2	Färbungen mit der Labeled Strept-Avidin-Biotin-Methode (LSAB) .....	39
3.3.7.3	Färbungen mit der Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline- Phosphatase-Methode (APAAP) .....	40

## INHALTSVERZEICHNIS

---

3.3.7.4	Immunfluoreszenz und Doppelimmunfluoreszenz.....	41
3.3.7.5	Apoptosedarstellung mittels TUNEL-Technologie.....	43
3.3.7.6	Auswertung der Immunhistochemie.....	43
3.3.8	Real-time RT-PCR.....	44
3.3.8.1	mRNA Isolierung.....	44
3.3.8.2	cDNA Synthese.....	45
3.3.8.3	Amplifizierung der cDNA.....	45
3.3.8.4	Kontroll-PCR (Polymerase Kettenreaktion).....	45
3.3.8.5	Real-time quantitative PCR (TaqMan Sonde).....	46
3.3.8.6	Auswertung der real-time PCR (TaqMan Sonde).....	47
3.3.9	Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	48
3.3.9.1	IP10 und MIG ELISA.....	48
3.3.9.2	Konzentrationsbestimmung von IP10 und MIG in murinen Serum.....	48
3.3.10	Zellkultur.....	49
3.3.10.1	Standardkultivierung von Zellen.....	50
3.3.10.2	Apoptosestimulation mit IP10.....	52
3.3.10.3	Stimulierung der ROS-Bildung durch IP10.....	52
3.3.11	Statistische Auswertung.....	53
3.4	Ergebnisse.....	54
3.4.1	Der Einfluss von IP10 und MIG auf die Rekrutierung CXCR3 <sup>+</sup> Zellen.....	54
3.4.1.1	Hochregulierung von IP10, MIG und CXCR3.....	54
3.4.2	Expriemierung von CXCR3 auf hämatopoetischen Zellen.....	56
3.4.2.1	Zelluläre Zusammensetzung der Intimahyperplasie.....	57
3.4.2.2	Expriemierung von CXCR3 auf T-Zelle, Endothelzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen.....	57
3.4.3	Verminderung von Intimahyperplasie durch Blockade der CXCR3-IP10-MIG-Achse.....	60
3.4.3.1	Reduktion der Intimahyperplasie durch genetische CXCR3- Defizienz.....	60
3.4.3.2	Reduktion der Intimahyperplasie durch Blockade von IP10 und MIG.....	61
3.4.4	Der Einfluss von CXCR3 auf die zelluläre Zusammensetzung der Intimahyperplasie.....	63

## INHALTSVERZEICHNIS

---

3.4.4.1	Verminderung von Inflammation und geringer Rekrutierung hämatopoetischen Vorläuferzellen infolge einer CXCR3-Defizienz.....	63
3.4.4.2	Verminderte Inflammation und reduzierte Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellen nach anti-IP10/ anti-MIG pAb-Behandlung.....	65
3.4.5	Reduktion der Reendothelialisierung nach Gefäßverletzung durch IP10 und MIG.....	66
3.4.6	Aktivierung der pro-inflammatorischen Chemokine EMAP-II und SDF-1 $\alpha$ durch Gefäßverletzung.....	68
3.4.6.1	Aktivierung von EMAP-II durch die CXCR3-Achse.....	68
3.4.6.2	Reduzierte SDF-1 $\alpha$ Aktivierung durch Blockade von CXCR3.....	70
3.4.7	Reduktion der verletzungsinduzierten Apoptose durch die Blockade der CXCR3-Achse.....	72
3.4.8	Induktion von Apoptose und ROS-Bildung in Endothelzellen und Monozyten durch IP10.....	75
3.4.9	Aktivierung von mTORC1 durch Gefäßverletzung über CXCR3-Achse.....	77
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>80</b>

4.1.	Das Versuchsmodell.....	80
4.1.1	Intimahyperplasie nach intraluminaler Gefäßverletzung in der Maus.....	80
4.2.	mTOR Aktivierung durch die CXCR3-Liganden IP10 und MIG als zentraler Mechanismus bei kardiovaskulären Erkrankungen.....	82
4.2.1	Der Einfluss der CXCR3-Chemokine IP10 und MIG auf Inflammation und Rekrutierung von Vorläuferzellen nach der Gefäßverletzung.....	82
4.2.2	Beeinträchtigung der Reendothelialisierung nach Gefäßverletzung durch IP10 und MIG.....	84
4.2.3	Die Rolle von mTORC1 bei der Bildung von Sauerstoffradikalen und der Induktion von Apoptose durch IP10 und MIG.....	85
4.3	Schlussfolgerungen und Ausblicke.....	88

## **INHALTSVERZEICHNIS**

---

<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>120</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>121</b>
<b>10</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>123</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>127</b>



### 1 EINLEITUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen spielen eine überaus bedeutende Rolle in der medizinischen Versorgung; insbesondere die koronare Herzerkrankungen ist eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt (BRAUNWALD 1997). Die Einführung der nicht-chirurgischen Behandlung von symptomatischen Koronarstenosen mittels der perkutanen, transluminalen, koronaren Angioplastie (PTCA) revolutionierte in den Achtziger und Neunziger Jahren die Behandlung der symptomatischen Herzerkrankung und verdrängte die weitaus invasivere Bypasschirurgie (GRUNTZIG et al. 1979). Der langfristige Erfolg dieser Therapieform wird jedoch durch das Auftreten einer sogenannten Restenose gemindert (FISCHMAN et al. 1994; SERRUYS et al. 1994). Als Restenose bezeichnet man einen Lumenverlust des behandelten Gefäßes innerhalb von sechs Monaten nach einer Intervention, der auf eine überschießende Reaktion der Gefäßwand auf die initiale Verletzung zurückzuführen ist. Pathophysiologische Prozesse wie Inflammation, Rekrutierung von Vorläuferzellen, Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen sind für diese Veränderung verantwortlich (KOMATSU et al. 1998; FARB et al. 2002). Insbesondere die Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) induzierte Th1-Immunantwort scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen (MACH et al. 1998; ZOHLNHÖFER et al. 2001b). Die Therapiemöglichkeiten zur Verhinderung einer Restenose sind bisher begrenzt. Als wirksamste Therapie zur Reduktion der koronaren Restenose hat sich die Implantation intrakoronarer Medikamenten-freisetzender Stents (Drug-eluting Stent = DES) erwiesen (ARJOMAND et al. 2003; MOSES et al. 2006). In verschiedenen breit angelegten Studien hat sich gezeigt, dass durch das Makrolidantibiotikum Rapamycin eine signifikante Reduzierung der Restenoserate bei Patienten herbeigeführt werden kann (SOUSA et al. 2001; MOSES et al. 2003; KASTRATI et al. 2005). Rapamycin führt durch anti-inflammatorische, anti-proliferative und anti-migratorische Wirkungen zur Hemmung der Zellproliferation glatter Muskelzellen, welche die Restenose verursachen (MARX u. MARKS 2001; SEHGAL 2003). Dabei bindet Rapamycin an mammalian Target of Rapamycin (mTOR), eine hochkonservierte und essentielle Kinase, und verhindert somit die Restenose.

Jedoch sind die genauen molekularen Mechanismen, die hierbei aktiviert oder gehemmt werden, bisher ungeklärt. Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, die zugrunde liegenden pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen der Th1-vermittelten

## **EINLEITUNG**

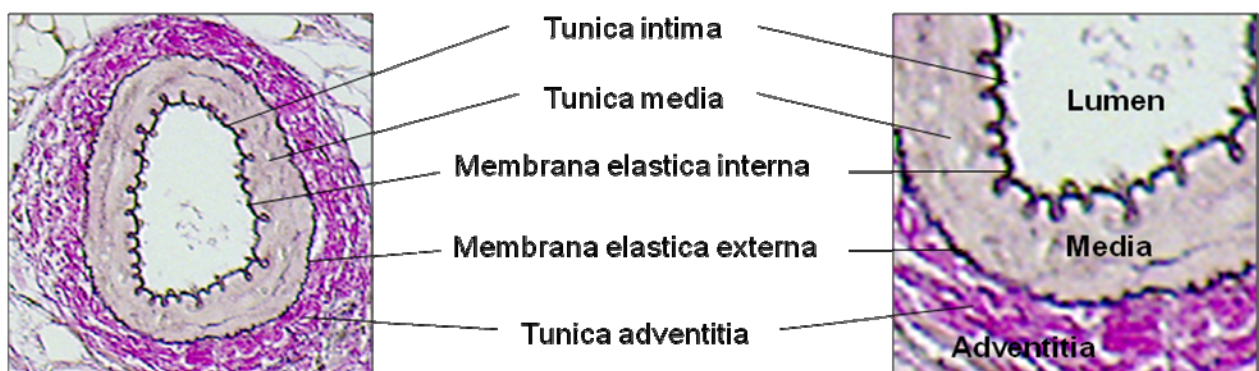
---

Entzündungsreaktion, einer Aktivierung von mTOR nach Gefäßverletzung und der Restenose aufzuklären. Langfristig sollen die Ergebnisse dieser Arbeit zur Entwicklung neuer Therapien vasoproliferativer Erkrankungen beitragen.

## **2        SCHRIFTTUM**

### **2.1        Aufbau von Arterien muskulären Typs**

Je nach Funktion und Lokalisation müssen Arterien verschiedenen Ansprüchen genügen und unterscheiden sich daher sowohl in ihrem Aufbau als auch in ihrer Zellzusammensetzung. Es gibt Arterien elastischen Typs sowie Arterien vom muskulösen Typs (HARKNESS et al. 1955). Die größeren elastischen Arterien wandeln physiologisch den pulsatilen Blutfluss durch die so genannte Windkesselfunktion in eine kontinuierliche Strömung um. Bei Atherosklerose ist diese Schwingungseigenschaft stark vermindert, was zu Bluthochdruck, Schlaganfall und Aneurysma führen kann. Der kleinere muskulöse Gefäßtyp ist durch die glatte Muskulatur maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Blutdruckes beteiligt. Die Koronargefäße, die den Herzmuskel mit Blut versorgen, zählen aufgrund ihres Aufbaus zum muskulösen Typ. Die Koronararterien sind Terminalarterien, da sie keine Umgehungskreisläufe haben. Kommt es wie bei der Atherosklerose durch Ablagerungen in den Gefäßwänden zu einer Verringerung des Gefäßdurchmessers und zu einer Versteifung des Gefäßes spricht man von der koronaren Herzkrankheit. Charakteristisch für alle Koronararterien ist ein muskulöser Wandaufbau (HABERMEHL 1966; GENESER 1990).



**Abbildung 1:    Aufbau einer Arterie muskulären Bautyps (nach HESS 1992)**

<u>Tunica Intima:</u>	Endothel: einschichtiges Plattenepithel Lamina propria intimae: Bindegewebe mit Kollagen und elastischen Fasern
<u>Tunica media:</u>	Membrana elastica interna (IEM) mit angrenzenden ringförmig

angeordneten glatten Muskelzellen

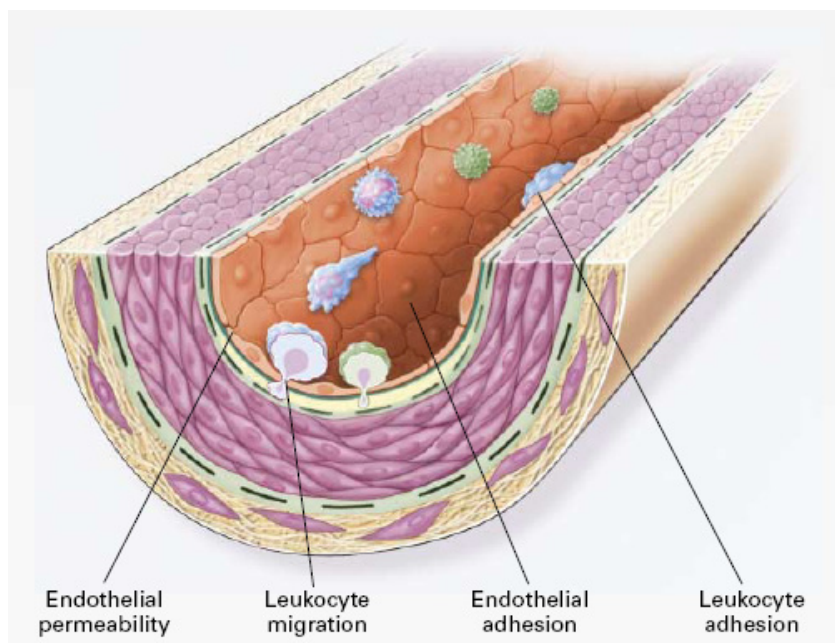
Membrana elastica externa (EEM)

Tunica adventitia: Kollagen und elastische Fasern

## **2.2 Atherosklerose**

### **2.2.1 Pathophysiologie der Atherosklerose**

Die Entstehung der Atherosklerose ist ein multifaktorieller und progressiver Prozess, der sich aus vielfältigen pathologischen Mechanismen zusammensetzt. Die Ätiologie der Atherosklerose basiert einerseits auf Dyslipoproteinämie und Bewegungsmangel, andererseits auf familiärer Disposition, Geschlecht und Lebensalter. Kardiovaskuläre Risikofaktoren (LDL (Low Density Lipoprotein)-Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus) schädigen das Gefäßendothel und führen so zu einer endothelialen Dysfunktion, im Rahmen derer es zur Rekrutierung von Leukozyten und somit zur Entwicklung eines inflammatorischen Geschehens in der Gefäßwand kommen kann (ASSMANN et al. 1999; ROSS 1999). Dieser Entzündungsprozess spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose. Dabei unterscheidet sich die zelluläre Interaktion in der Arterie nicht fundamental von anderen chronischen inflammatorischen und fibroproliferativen Erkrankungen wie zum Beispiel der Leberzirrhose, rheumatoide Arthritis, Nierenglomerulosklerose, pulmonalen Fibrose und chronischer Pankreatitis (ROSS 1999).



**Abbildung 2:**  
**Atherosklerose – eine**  
**inflammatorische**  
**Erkrankung (nach**  
**ROSS 1999)**

Durch  
spezifische

Rezeptoren, die auf dem Endothel gebildet werden, kommt es zur Adhäsion, Migration und Akkumulation von Monozyten und T-Zellen. Dabei kommt es durch den veränderten Blutfluss und der Expression der Adhäsionsmoleküle zuerst zum Rollen und Adhärenz der Monozyten und T-Zellen (DONG et al. 1998; COLLINS et al. 2000). Anschließend kommt es durch Chemotaxis zur Akkumulation von Makrophagen und T-Zellen. Für diesen Effekt ist hauptsächlich das Chemokinsystem verantwortlich (WEBER 2007). Die Aktivierung von Monozyten und T-Zellen führt zu einer Hochregulierung von Rezeptoren auf ihrer Oberfläche die Adhäsionsmoleküle, Immunglobuline und chemotaktische Moleküle binden. Diese Liganden-Rezeptor-Interaktionen aktivieren weitere mononukleare Zellen und unterstützt die Lokalisation der inflammatorischen Antwort in der Läsion.

Neben diesem entzündlichen Geschehen stellt die Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (Smooth Muscle Cell, SMC) in die neu entstehende Läsion einen Schlüsselprozess der Atherosklerose dar (GIMBRONE 1999). Dabei wird die Proliferation der SMCs über multiple Wachstumsfaktoren (z.B. platelet-derived growth factor (PDGF), insulin like growth factor 1(IGF1)) gesteuert (BORNFELDT et al. 1994). Diese SMCs gehen auf der einen Seite aus bereits residenten Zellen der Intima hervor oder migrieren aus der Media oder Adventitia (BENTZON et al. 2007). Auf der anderen Seite ist eine Differenzierung aus zirkulierenden Progenitorzellen zu vaskulären glatten Muskelzellen nachgewiesen worden (SATA et al. 2002). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl der Inflammation sowie der Proliferation und Migration von SMCs eine bedeutende Rolle in der Entstehung der Atherosklerose zukommen. Durch die zunehmenden atherosklerotischen Veränderungen kommt es zu flusslimitierenden Koronarstenosen, welche sich in der koronaren Herzerkrankung manifestieren.

### **2.2.2 Therapie der Atherosklerose**

Neben den unterstützenden Maßnahmen wie einer Änderung der Lebens- und Ernährungsgewohnheiten stehen medikamentöse und invasive Verfahren zur Therapie der Atherosklerose zur Verfügung. Während es das Ziel der medikamentösen Therapie ist, den Cholesterinspiegel, den Blutdruck und den Blutzuckergehalt zu senken und so die vasodynamischen Parameter zu beeinflussen, ist die interventionellen Therapie auf eine vollständige

Wiederherstellung der verletzten Gefäßes ausgerichtet (GRUNTZIG et al. 1979; ASSMANN et al. 1999).

Zu den etablierten interventionellen Verfahren zählen die kardiochirurgische Bypass-Operation sowie die perkutane, transluminale, koronare Angioplastie (PTCA) welche heute eine bedeutsame symptomatische Therapieform der koronaren Herzerkrankung darstellt (GRUNTZIG et al. 1979). Über einen Führungsdraht wird ein Ballonkatheter eingeführt und im Bereich des atherosklerotischen und stenotischen Plaques eine Dilatation herbeigeführt. Erstens kommt es zur Kompression des atherosklerotischen Plaques, zweitens führt diese Gefäßdilatation zu Einrissen in das Plaque und in die Intima. Während des Heilungsprozesses dieser Gefäße kommt es bei etwa 30-40% der Patienten nach 6 bis 7 Monaten nach primär erfolgreicher PTCA zu einer Restenose (DUNDAR et al. 2004). Als Restenose bezeichnet man einen Lumenverlust des behandelten Gefäßes innerhalb von 6 Monaten nach Intervention, der auf eine überschießende Reaktion der Gefäßwand auf die initiale Verletzung zurückzuführen ist. Die bisher einzige erfolgreiche Therapie zur Reduktion der koronaren Restenose stellt die Implantation intrakoronarer Stents dar, die das Risiko der Restenose auf ungefähr 20-30% reduziert (ARJOMAND et al. 2003). Dabei wird eine selbstexpandierende Gefäßstütze aus Edelstahl (Stent) in den beschädigten Gefäßbereich installiert. Trotzdem liegen die primären angiographischen Erfolgsraten weiterhin bei 20-30% der behandelten Patienten, und bei 20% der Patienten die mit einem unbeschichteten Stent behandelt wurden, ist eine erneute Intervention nötig (FISCHMAN et al. 1994; SERRUYS et al. 1994).

Die Einführung von Medikamenten-freisetzenden Stents (Drug-eluting Stents = DES) hat zu einer signifikanten Reduktion des Restenoserisikos nach Koronarintervention geführt. DES-Stents haben eine Polymer-Beschichtung in der ein pharmakologischer Wirkstoff gebunden ist. Durch zeitlich verzögerten Abbau des Polymers kommt es zu einer kontinuierlichen Freisetzung des Pharmakons am Ort der Gefäßverletzung über 2-4 Wochen. Für eine pharmakologische Substanzen konnte eine hohe Wirksamkeit nachgewiesen werden: Rapamycin. Rapamycin konnte seine Wirksamkeit bei der Verhinderung der Restenose in mehreren Studien (RAVEL, SIRIUS, E-SIRIUS und C-SIRIUS) deutlich unter Beweis stellen (MOSES et al. 2003; KASTRATI et al. 2005). Nebenwirkungen wie eine späte Stent-Thrombose oder die Ausbildung proximaler und distaler Stenosen („candy wrapper effect“)

zeigen jedoch die Notwendigkeit weiterer Studien auf diesem Gebiet (VIRMANI et al. 2004).

### **2.3. Restenose und Intimahyperplasie**

#### **2.3.1 Pathophysiologie der Restenose und Intimahyperplasie**

Die Ursachen für die Restenose nach Ballonangioplastie und Stentimplantation sind unterschiedlich. Der Lumenverlust nach Ballonangioplastie lässt sich auf den sich negativ auswirkenden Umbauprozess („negatives Remodeling“) zurückführen. Die Restenose nach Stentimplantation resultiert zu über 90% der Fälle aus der Bildung einer sogenannten Neointimahyperplasie (MINTZ et al. 1996). Diese Neointima oder auch Intimahyperplasie besteht zum größten Teil aus extrazellulärer Matrix (KOMATSU et al. 1998; VIRMANI u. FARB 1999). Als zelluläre Anteile sind vor allem proliferierende SMCs und inflammatorische Zellen zu nennen (KOMATSU et al. 1998; VIRMANI u. FARB 1999).

Bei der Stentimplantation kommt es zur Verletzung und Denudation der arteriellen Gefäßwand. Das führt zu einer Reihe von intravaskulären Veränderungen, die als ein überschießender Heilungsprozess angesehen werden.

Als einen der Auslöser für die initiale proliferative Gefäßreaktion beschreibt Clowes die Endotheldenudation, wodurch die Barrierefunktion und die regulatorischen Eigenschaften, u. a. die Inhibierung der Proliferation der glatten Muskelzellen, wegfallen (CLOWES et al. 1983). Außerdem spielt die initiale Schädigung der glatten Muskulatur der Media durch die Katheterintervention mit der Freisetzung intrazellulärer Mitogene eine entscheidende Rolle (CLOWES et al. 1989). So korreliert die Stärke der initialen medialen Verletzung signifikant positiv mit der Höhe der Restenoserate und der Inflammationsreaktion (FARB et al. 1999; FARB et al. 2002). Eine höhere Zelldichte an inflammatorischen Zellen ist hingegen mit einer stärkeren Neointimaproliferation assoziiert (ROGERS et al. 1998; DANENBERG et al. 2002).

Durch die Katheterintervention und Stentimplantation wird ein Pathomechanismus initiiert, der sich in 4 Phasen einteilen lässt (KOMATSU et al. 1998; POON et al. 2002):

I.) Endotheliale Denudation und Plaqueruptur

Durch die Gefäßverletzung und die Stentimplantation kommt es zunächst zu einer endothelialen Denudation mit Plaqueruptur und Freilegung subendothelialer Gefäßschichten.

II.) Thrombozytenablagerung, -aktivierung und Thrombusformation

Als Antwort auf diesen Verletzungsreiz wird die Blutgerinnung aktiviert, was zur Thrombozytenablagerung mit nachfolgender Thrombozytenaktivierung und Thrombusformation führt.

III.) Aktivierung von Botenstoffen

Konsekutiv kommt es zu einer Freisetzung von Mitogenen sowie zur Rekrutierung von Monozyten und Granulozyten. Dadurch werden chemotaktisch und proliferativ wirkende Botenstoffe aktiv und es kommt zur Entdifferenzierung, Proliferation und Emigration glatter Muskelzellen.

Diese Entzündungs- und Proliferationsprozesse finden ganz überwiegend innerhalb des ersten Monats nach Stentimplantation statt und sind dann weitgehend abgeschlossen.

IV.) Neointimabildung, Intimahyperplasie

Die Neointima schließlich besteht zum größten Teil aus entdifferenzierten glatten Muskelzellen. Zum weiteren Lumenverlust des Gefäßes und zur Restenose führt die überschießende Bildung extrazellulärer Matrix (FARB et al. 1999; VIRMANI u. FARB 1999).

### **2.3.2 Bedeutung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in der Pathophysiologie der Restenose und Intimahyperplasie**

Zirkulierende Progenitorzellen aus dem Knochenmark spielen eine wichtige Rolle in der Reaktion der Gefäßwand auf eine Verletzung. Die Katheterintervention induziert eine Gefäßwandverletzung, die zunächst zur Blutgerinnungsaktivierung sowie zur Rekrutierung von Entzündungszellen wie Granulozyten und Monozyten führt. Parallel zu diesen Entzündungsreaktionen kommt es zur Entdifferenzierung, Proliferation und Migration glatter Muskelzellen der Media und zur Produktion



extrazellulärer Matrix (R. S. SCHWARTZ 1998; FARB et al. 1999). Neuere Daten sprechen zudem dafür, dass im peripheren Blut zirkulierende, pluripotente Progenitorzellen zur Bildung der Intimahyperplasie entscheiden beitragen, indem sie an das verletzte Endothel adhären, zu glatten Muskelzellen ausdifferenzieren, proliferieren und somit zur Zunahme der glatten Muskelzellen in der Intimahyperplasie führen (ZOHLNHÖFER et al. 2001b; SATA et al. 2002; SCHOBER et al. 2003; YOKOTE et al. 2003; ZERNECKE et al. 2005). Sata et al. zeigte beispielsweise, dass 60% der neointimalen und ca. 40% der medialen Zellen der verletzten Gefäßwandzellen der Maus aus dem Knochenmark abstammen (SATA et al. 2002). Ebenso konnten in Genexpressionsanalysen an humaner Neointima Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen wie CXCR4, Integrin beta 7 und CD13 identifiziert werden (ZOHLNHÖFER et al. 2001b). Darüber hinaus zeigt sich, dass der Ligand von CXCR4, das Chemokin Stromal-derived-Factor-1 (SDF-1 $\alpha$ ), eine wesentliche Rolle für die Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark an den Ort der Gefäßverletzung spielt (ZERNECKE et al. 2005; MASSBERG et al. 2006). SDF-1 $\alpha$  führt zur Mobilisierung und Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen aus dem Knochenmark durch Chemotaxis, Adhäsion und Aggregation; eine Hemmung von SDF-1 $\alpha$  führt im Tiermodell zu einer signifikanten Reduktion der Intimahyperplasie (KUCIA et al. 2004; ZERNECKE et al. 2005; MASSBERG et al. 2006).

Ein weiterer entscheidender Mechanismus, an dem zirkulierende hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark beteiligt sind, ist die Wiederherstellung eines intakten Endothels nach Gefäßverletzung (DIMMELER u. ZEIHNER 2004). So kann eine frühe und vollständige Reendothelialisierung durch zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen die Bildung atherosklerotischer Plaques vermindern und das Risiko einer Restenose nach Stentimplantation verringern (CARMELIET et al. 1997; S. M. SCHWARTZ 1997; CARMELIET 2000; WERNER et al. 2002; DIMMELER u. ZEIHNER 2004). Im Mausmodell werden zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark an den Ort der Gefäßverletzung rekrutiert und führen zu einer verbesserten und schnelleren Endothelbildung (WALTER et al. 2002; WERNER et al. 2002).

### **2.3.3 Die Bedeutung der Entzündungsreaktion in der Pathophysiologie der Restenose und Intimahyperplasie**

Im Vergleich mit Ballonangioplastie reduziert die Stentimplantation die Restenoserate und ist so zum Behandlungsstandard in der katheterbasierten koronaren Revaskularisierung für atherosklerotische Verletzungen geworden. Dennoch stellt die Restenose einen limitierenden Faktor bei der Behandlung der koronaren Restenose dar. Untersuchungen im Tiermodell zeigen, dass die Stentimplantation mit der Akkumulation von Monozyten assoziiert ist, die wiederum mit dem Ausmaß der Proliferation neointimaler glatter Muskelzellen und letztlich mit dem Ausmaß der Intimahyperplasie korreliert (ROGERS et al. 1996; FARB et al. 2002). In anderen Modellen korreliert die lymphohistiozytäre Zellinfiltration ebenfalls mit dem Ausmaß der Intimahyperplasie und dem Lumenverlust (KORNOWSKI et al. 1998). Dementsprechend zeigen mehrere Studien, dass die therapeutische Hemmung der Entzündungsreaktion zu einer Reduktion des Risikos einer Intimahyperplasie führt (YASUKAWA et al. 1997; ROGERS et al. 1998).

### **2.3.3.1 Die Bedeutung der Th1-Immunantwort für Restenose und Intimahyperplasie**

Bei der Entstehung der Restenose sind verschiedene Zelltypen beteiligt. Neben hämatopoetischen Vorläuferzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen spielen auch Leukozyten eine wesentliche Rolle in der Entstehung der Intimahyperplasie. Es können aktivierte T Lymphozyten in der frühen Phase der Gefäßverletzung nachgewiesen werden, die durch ihre Persistenz und Lokalisation am Ort der Verletzung wichtige Aspekte der Restenose organisieren (MACH et al. 1998). Die Hemmung der frühen inflammatorischen Reaktion ist mit einer signifikanten Reduktion der Intimahyperplasierate verbunden (ROGERS et al. 1998; DANENBERG et al. 2002). Auch das Ausmaß anderer vasoproliferativer Erkrankungen wie der Atherosklerose oder Gefäßabstoßungsreaktionen korreliert mit der Stärke der Th1-Immunantwort (MACH et al. 1998; ZEIFFER et al. 2004; BURNS et al. 2005). Genexpressionsanalysen der humanen Neointima zeigen, dass es durch die Gefäßverletzung zur Aktivierung von allgemein pro-inflammatorischen Genen wie Cyclooxygenase-I und dem 70kDa heat-shock-protein B kommt (ZOHLNHÖFER et al. 2001a). Interessanterweise sind auch 37 Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) assoziierte Gene vermehrt exprimiert (ZOHLNHÖFER et al. 2001a). Humane und murine Studien

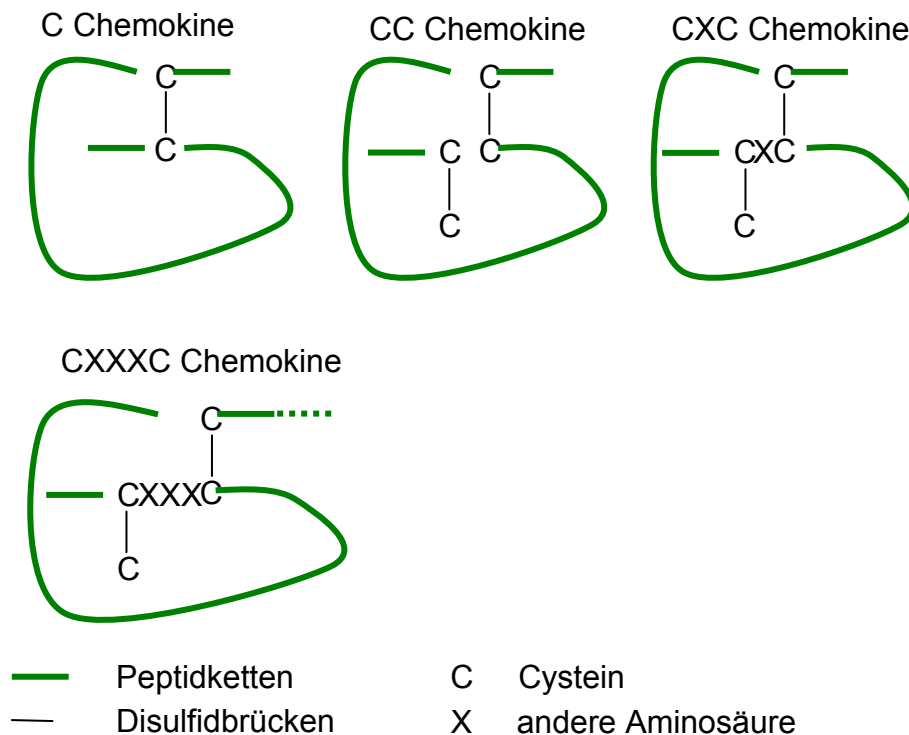
belegen, dass sowohl CD4<sup>+</sup> T Lymphozyten als auch IFN- $\gamma$  in atherosklerotischen Gebieten lokalisiert sind und entscheidend zur Bildung der Intimahyperplasie beitragen (GUPTA et al. 1997; VIRMANI u. FARB 1999; ZOHLNHÖFER et al. 2001b).

IFN- $\gamma$  spielt eine entscheidende Rolle in der Regulierung und Modulation der zellulären Immunität, da es die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und MHC-II-Expression bei Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Monozyten stimuliert (LEON u. ZUCKERMAN 2005). Trotz der wachsenden Anzeichen für die Beteiligung von T-Lymphozyten in der Gefäßverletzung ist der genaue Mechanismus, wie T-Lymphozyten in das verletzte Gewebe rekrutiert werden und welche genauen Auswirkungen diese Rekrutierung hat, nicht vollständig bekannt.

## **2.4 Die Bedeutung von Chemokinen in der Restenose und Intimahyperplasie**

Die Rekrutierung und Akkumulation von Leukozyten und anderen zirkulierenden Zellen an den Ort der Entzündung wird über eine Familie von so genannten Chemokinen und ihren Rezeptoren reguliert (GODESSART 2005). Chemokine sind wichtige kleinmolekulare Zytokine (90-130 Aminosäuren, 8-14kDa) mit chemotaktischer Wirkung, die von vielen Zelltypen, u. a. Makrophagen, aber auch von Gewebszellen, wie zum Beispiel Endothelzellen und glatten Muskelzellen, sezerniert werden können. Sie steuern die Aktivierung, Chemotaxis, Migration und Extravasation von Leukozyten und von aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen während der Immunantwort (MACH et al. 1999). Das humane Chemokinsystem umfasst annähernd 50 Liganden und 20 G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Zwei große Familien sind charakterisiert worden, deren Zugehörigkeit anhand der NH<sub>2</sub>-terminalen Lage zweier benachbarter Cysteinreste festgelegt wird (BAGGIOLINI et al. 1994). Diese Klassifizierung basiert auf der relativen Position des Cysteinrestes. CC-Chemokine sind durch zwei unmittelbar benachbarte Cysteine charakterisiert. Die CXC Chemokine weisen eine weitere Aminosäure (X) zwischen zwei Cysteinen auf. Zwei Mitglieder der Chemokinfamilie passen jedoch nicht in dieses Schema: Lymphotactin mit nur einem Cysteinrest (C-Chemokine) und Fractalkine (CXXXC-Chemokine), dessen beide Cysteine durch drei

Aminosäurereste voneinander getrennt sind (KELNER et al. 1994; BAZAN et al. 1997).



**Abbildungen 3:      Struktur von verschiedenen Chemokinen**

Des Weiteren können die CXC Chemokine ausgehend von der Anwesenheit (ELR) und Abwesenheit (non-ELR) der NH<sub>2</sub>-terminalen Sequenz Glutamyl-Leucyl-Arginin klassifiziert werden. Die ELR-enhaltenden CXC-Chemokine (z.B.: IL-8) locken Neutrophile an, wohingegen non-ELR CXC-Chemokine chemotaktisch auf Lymphozyten wirken (STRIETER et al. 1995; BELPERIO et al. 2000). Zusätzlich sind CXC Chemokine je nach Anwesenheit oder Abwesenheit von ELR an ihrem aminoterminalen Ende starke Promotoren bzw. Inhibitoren der Angiogenese (BELPERIO et al. 2000; LE et al. 2004; STRIETER et al. 2005). Bei den non-ELR CXC Chemokinen sind zwei durch IFN- $\gamma$  induzierbar und wirken chemotaktisch auf aktivierte T-Lymphozyten. Es handelt sich dabei um IP10 (Interferon-inducible protein 10, CXCL10) und MIG (monokine induced by IFN- $\gamma$ , CXCL9). Diese beiden Liganden haben den gemeinsamen Rezeptor CXCR3.

Chemokinrezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die sieben transmembranständige Regionen an der Zelloberfläche aufweisen. Die Beteiligung von verschiedenen CXC Chemokinen im Netzwerk der Tumorangiogenese und -

angiostase konnten nachgewiesen werden (LE et al. 2004). Darunter sind auch der CXCR3 Rezeptor und seine Liganden IP10 und MIG, denen eine sehr wichtige Rolle in der Rekrutierung von CXCR3 exprimierenden T-Zellen während der zellulären Immunantwort zugeschrieben wird (MACH et al. 1999; LE et al. 2004; OKAMOTO et al. 2007).

#### **2.4.1 Die Rolle der CXCR3-IP10-MIG-Achse in der Gefäßverletzung**

Die zelluläre Spezifität der einzelnen Chemokine wird durch eine restriktive Expression der Chemokinrezeptoren auf den spezifischen Zelltypen festgelegt (GODESSART 2005). Der Chemokine Rezeptor CXCR3 und seine Liganden IP10 und MIG stimulieren vor allem aktivierte T-Lymphozyten und spielen eine große Rolle in der Effektorkaskade von IFN- $\gamma$  als auch in der T-Lymphozyten abhängigen Antitumor-Aktivität (LUSTER u. LEDER 1993; LOETSCHER et al. 1996; MACH et al. 1999; LE et al. 2004; OKAMOTO et al. 2007). Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung konnte im Vergleich zu Gesunden ein signifikant erhöhter IP10-Serumspiegel gemessen werden; in humanem atherosklerotischen Plaque ließen sich sowohl CXCR3 als auch seine Liganden IP10 und MIG nachweisen (MACH et al. 1999; KAWAMURA et al. 2003). So führt die Blockade oder genetische Deletion der CXCR3-Achse zu einer verminderten Rekrutierung von T-Zellen an die Stelle der inflammatorischen Gefäßverletzung und es wird von positiven Effekten auf das Frühstadium der Atherogenese berichtet (XIE et al. 2003; VEILLARD et al. 2005; VAN WANROOIJ et al. 2008). Die Aktivierung des CXCR3-Signalweges durch IP10 und MIG führt zur vermehrten Rekrutierung von T-Zellen und zur Aktivierung von Chemotaxis (BONECCHI et al. 1998; PIALI et al. 1998; GASPERINI et al. 1999).

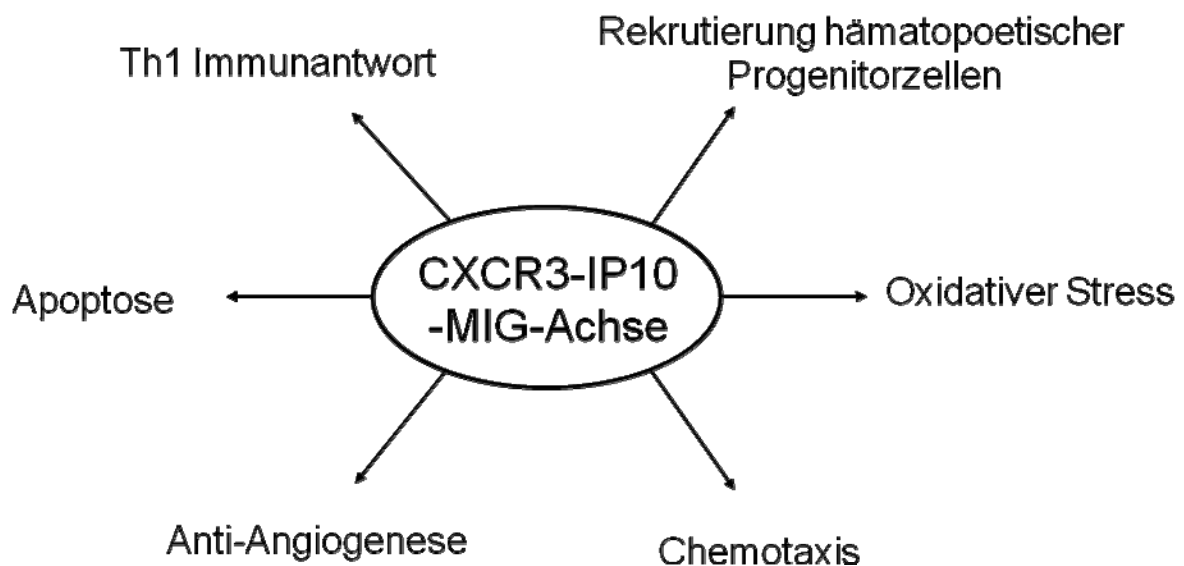
Neben ihrer pro-inflammatorischen Wirkung auf Th1-Zellen, wirken die beiden Chemokine IP10 und MIG durch Bindung an CXCR3 interessanterweise auch auf CD34-positive hämatopoetische Progenitorzellen chemotaktisch und stimulieren deren Adhäsion und Aggregation (JINQUAN et al. 2001).

Des Weiteren haben IP10 und MIG im Rahmen der späten Entzündungsreaktion eine Bedeutung als anti-angiogenetische Faktoren. So hemmt IP10 die durch VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) vermittelte Migration von Endothelzellen und besitzt dadurch anti-angiogenetische Effekte, die zur reduzierten

Bildung neuer Gefäßstrukturen führt (LUSTER et al. 1995; BELPERIO et al. 2000; ROMAGNANI et al. 2001; BODNAR et al. 2006).

Ein zusätzlicher Effekt von IP10 und MIG, der eine große Rolle in der Entstehung und dem Ausmaß der Intimahyperplasie spielen könnte, ist die direkte Bildung von Sauerstoffradikalen und die Induktion von Apoptose in CXCR3<sup>+</sup> Zellen (BEK et al. 2003; ZHANG et al. 2005; SUZUKI et al. 2007). Die Bindung der Liganden IP10 und MIG an CXCR3 führt zu einem intrazellulären Anstieg des Ca<sup>2+</sup> Spiegel und zu einer Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und der Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) (LUSTER 1998). Der genaue Signaltransduktionsweg ist jedoch noch nicht völlig geklärt und bedarf weiterer Forschungsarbeit.

Die hier zusammengefassten Daten sprechen in der Gesamtheit dafür, dass die Aktivierung der CXCR3-IP10-MIG-Achse im Rahmen der IFN- $\gamma$  induzierten Th1-Immunantwort nach Gefäßwandverletzung eine wichtige Schnittstelle zwischen Entzündungsreaktion, Apoptoseinduktion, oxidativem Stress, Rekrutierung zirkulierender Vorläuferzellen, Bildung einer Intimahyperplasie sowie der Hemmung der Reendothelialisierung darstellt.



**Abbildung 4: Die Aktivierung der CXCR3-IP10-MIG-Achse führt zu Apoptose, Chemotaxis, oxidativem Stress, Rekrutierung von hämatopoetischen Progenitorzellen, Th1-Immunantwort und Anti-Angiogenese**

## **2.5 Die Rolle von Sauerstoffradikalen und Apoptose in der Gefäßverletzung**

Während der frühen, unspezifischen Immunantwort kommt es zur Bildung von Sauerstoffradikalen, die bei exzessiver Aktivität zu zellulärem oxidativen Stress führen, der die Apoptose von Gefäßzellen zur Folge hat. Sowohl die Bildung von Sauerstoffradikalen als auch die Induktion von Apoptose stellen einen wesentlichen funktionellen Mechanismus bei kardiovaskulären Erkrankungen dar (LI et al. 1997; GRIENDLING u. FITZGERALD 2003; MADAMANCHI u. RUNGE 2007).

### **2.5.1 Sauerstoffradikale und oxidativer Stress**

Sauerstoffradikalverbindungen (ROS, Reactive Oxygen Species) beinhalten Superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ), Wasserstoffperoxid, Hydroxyl-Radikale und eine Vielzahl ihrer Reaktionsprodukte (LAMBETH 2004). Sie spielen, wie in den letzten Jahren gezeigt werden konnte, bei zahlreichen biologischen Prozessen eine Rolle. Während man zunächst davon ausging, ROS würden in erster Linie in Phagozyten gebildet und seien primär direkt an der Abwehr von Mikroorganismen im Rahmen des Oxidatory Burst beteiligt, gelangt man in letzter Zeit zu der Ansicht, dass sie vor allem als Signalmoleküle dienen (FINKEL 2003). Zahlreiche Wachstumsfaktoren können die ROS-Produktion stimulieren, wobei die Entstehung der reaktiven Sauerstoffverbindungen wichtig ist für die weitere Signaltransduktion (SHIOSE et al. 2001). ROS spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion von Insulin und von dem Wachstumsfaktor VEGF (BANFI et al. 2001). Zytokine, wie TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor alpha) oder IL-1 $\beta$  (Interleukin 1 $\beta$ ) führen ebenfalls zur Produktion von ROS, wobei gezeigt werden konnte, dass TNF receptor-associated factor 4 (TRAF4), eine Komponente des TNF Signalweges, direkt an eine Komponente des NADH/NADPH-Oxidase-Komplexes bindet (ARNOLD et al. 2001).

Da die Entstehung reaktiver Sauerstoffverbindungen oft mit einem Anstieg von phosphoryliertem Tyrosin assoziiert ist, ist die Beeinflussung der Tyrosinkinase/-phosphatase ein attraktiver Kandidat für ROS-vermittelte Effekte. Protein-Tyrosinphosphatasen besitzen in ihren aktiven Zentren reaktive Cysteine, welche sich durch ROS leicht oxidieren lassen und damit zur Inaktivierung der Tyrosinphosphatase führen (LEE et al. 1998).

Reaktive Sauerstoffverbindungen sind unter anderem an der Regulation des Zellwachstums, der Apoptose und der Regulation des Gefäßtonus beteiligt (GRIENDLING et al. 2000; DROGE 2002). In höheren Konzentrationen dagegen kommt es durch die exzessive Aktivität beim oxidativen Stress zur Schädigung der Zellen; sowohl direkt durch Lipidperoxidation oder durch oxidative Veränderung von Proteinen und DNA als auch indirekt durch die Beeinflussung redoxsensitiver Enzyme (LI et al. 1997; GRIENDLING u. FITZGERALD 2003; MADAMANCHI u. RUNGE 2007).

Der Sauerstoffradikalbildung und dem oxidativen Stress wird eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese verschiedener degenerativer Erkrankungen wie Krebs, Glomerulonephritis, Diabetes mellitus, Ischämie-Reperfusions-Schäden und Atherosklerose zugeschrieben (GRIENDLING et al. 2000; DROGE 2002). Zudem sind sie für den Ablauf von Alterungsprozessen relevant (FINKEL 2003).

### **2.5.2 Apoptoseinduktion in der Gefäßverletzung**

Die Apoptose, oder der programmierte Zelltod, ist ein physiologischer Prozess, der eine große Bedeutung für die embryonale Entwicklung sowie den Gewebsumbau durch Regulation des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Zelltod in Gefäßen und Organen des erwachsenen Menschen hat. Der Begriff „Apoptose“ wurde zum ersten Mal im Jahr 1972 zur Abgrenzung dieser spezifischen Art von Zelltod von Zelluntergängen durch Nekrose verwendet (KERR et al. 1972). Typische Merkmale der Apoptose sind (HAUNSTETTER u. IZUMO 1998; HENSON et al. 2001):

I.) Translokation von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran

II.) Aktivierung von spezifischen Proteasen, die sogenannten Caspasen, die bei Initiation und Fortgang der Apoptose eine Schlüsselrolle spielen

III.) Freisetzung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien

IV.) Kernschrumpfung mit Chromatinkondensation und enzymatischer DNA-Fragmentierung durch Endonukleasen



V.) Zellschrumpfung mit Zytoskelettdegradierung und Bildung apoptotischer Körperchen, die rasch von Nachbarzellen oder Phagozyten aufgenommen werden, wodurch Entzündungsreaktionen vermieden werden

Der gesamte Vorgang wird von einer Vielfalt an Transkriptionsfaktoren (z.B. *NF- $\kappa$ B*) und pro- bzw. anti-apoptotischen Proteinen (z.B. *Bax*, *Bcl-2*, *Bcl<sub>XL</sub>*) reguliert (SAXENA et al. 2002; ZAMPETAKI et al. 2005). Obwohl die Apoptose ein physiologischer Prozess ist und eine wichtige Grundlage für die Gewebshomöostase darstellt, kann unter pathologischen Bedingungen eine Dysregulation dieses Vorgangs auftreten. So stellt eine pathologisch dysregulierte Apoptose einen bedeutenden Mechanismus bei Atherosklerose sowie bei chronisch entzündlichen und degenerativen Krankheiten dar (KOCKX u. HERMAN 2000; SATA et al. 2000; ZERNECKE et al. 2005). Eine erhöhte Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen atherosklerotischer Plaques kann zur Plaqueruptur mit nachfolgenden kardialen Komplikationen führen (KOCKX u. HERMAN 2000). Ebenso trägt eine erhöhte Apoptose in medialen Zellen, z.B. nach Gefäßverletzung, zur Bildung einer inflammatorischen und proliferatorischen Gefäßreaktion bei. Eine erhöhte Apoptoserate in glatten Muskelzellen nach Gefäßverletzung wurde bereits nachgewiesen (SATA et al. 2000; ZERNECKE et al. 2005).

Aus diesen Gründen ist die Untersuchung dieses Prozesses und ein tieferes Verständnis seiner Regulation von besonderer Bedeutung für die Verbesserung der Kenntnisse über die Pathophysiologie und mögliche neue Therapieansätze bei atherosklerotischen Gefäßerkrankungen.

### **2.6 Die Bedeutung von Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) für Restenose und Intimahyperplasie**

Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) ist die englische Bezeichnung für ein Protein, das bei Untersuchungen, an welches Protein das Makrolidantibiotikum Rapamycin bindet, entdeckt worden ist. Bei mTOR handelt es sich um ein evolutionär hochkonserviertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 300kD. Es ist eine multifunktionale Kinase, die vor allem für die Proteinsynthese eine entscheidende Rolle spielt (GINGRAS et al. 2001). Mit der Aktivierung von mTOR ist

vor allem Zellwachstum verbunden, und damit auch die Aktivierung nachgeschalteter Effektoren wie Ribosomal Protein Kinase S6 (p70 S6 Kinase) (BROWN et al. 1995; ZOHLNHÖFER et al. 2004).

### **2.6.1 Die Rolle von mTOR, mTORC1 und mTORC2 in der Gefäßverletzung**

Der mTOR-Komplex wird durch Insulin, Wachstumsfaktoren oder die Verfügbarkeit von Nahrung (z.B.: Aminosäuren) aktiviert und reguliert die Proteintranslation und Zellproliferation (X. WANG u. PROUD 2006). Wang et al konnten zudem zeigen, dass die Proliferation von glatten Muskelzellen durch IFN- $\gamma$  induziert wird und dass dieser Signaltransduktionsweg eine Folge der Aktivierung des mTORC1 Komplexes ist (Y. WANG et al. 2007).

Der mTOR-Signalweg wird durch zwei verschiedene Multiproteinkomplexe vermittelt (LOEWITH et al. 2002; WULLSCHLEGER et al. 2006). mTORC1 beinhaltet das Adaptorprotein Raptor, reguliert Zellwachstum und Apoptose und aktiviert den nachgeschalteten Effektor p70 S6 Kinase (BROWN et al. 1995; GINGRAS et al. 2001; WULLSCHLEGER et al. 2006). Im Gegensatz dazu enthält der mTORC2-Komplex das Adapterprotein Rictor und reguliert räumliche Aspekte des Zellwachstums wie beispielsweise die Organisation des Actinskeletts in der Zelle (LOEWITH et al. 2002). Interessanterweise ist nur der mTORC1-Komplex, im Gegensatz zum mTORC2-Komplex, sensitiv für die pharmakologische Inhibierung durch Rapamycin und dessen Analoge (LOEWITH et al. 2002).

Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) ist ein vorgeschalteter Regulator des mTOR Signaltransduktionswegs und führt zur sequentiellen Phosphorylierung von mTORC1 und p70 S6Kinase. mTOR Aktivierung führt auf der einen Seite zur Phosphorylierung und damit Aktivierung der p70 S6 Kinase, auf der anderen Seite zur Phosphorylierung und Deaktivierung von 4EBP1 (BROWN et al. 1995; FINGAR et al. 2002).

Die p70 S6 Kinase beschleunigt die Proteinsynthese, phosphoryliert und aktiviert das S6-Protein der Ribosomal 40s-Untereinheit, was zu einer erhöhten Translation von mRNA-Transkripten führt (JEFFERIES et al. 1997). Durch die Phosphorylierung von 4EBP1 kommt es zur Unterbrechung der cap-abhängigen Translationsinhibierung, wodurch es zur Translation einiger spezifischer mRNAs

kommt, die eine wichtige Rolle für Zellwachstum und -proliferation spielen (GRAVES et al. 1995; BERETTA et al. 1996; BRUNN et al. 1997).

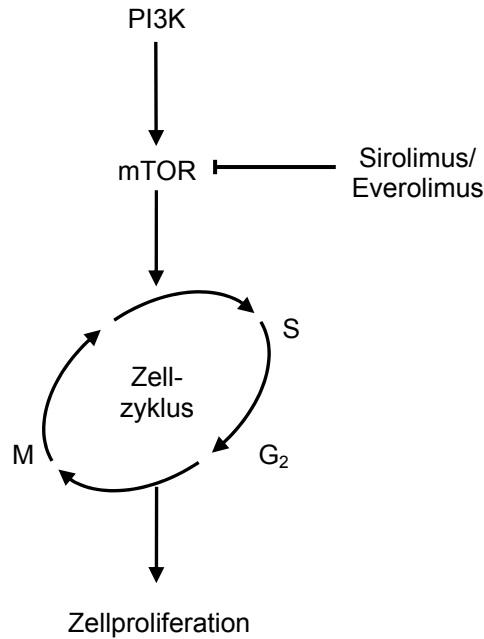
Die Proliferation glatter Muskelzellen ist stark an die Aktivierung von mTORC1 verbunden (LOEWITH et al. 2002; WULLSCHLEGER et al. 2006). Durch die pharmakologische Inhibierung des mTORC1-Komplexes mittels Rapamycin kann die Ausbildung einer Restenose durch Intimahyperplasie signifikant reduziert werden (MOSES et al. 2003; CASTRO et al. 2004; KASTRATI et al. 2005; NÜHRENBURG et al. 2005; NÜHRENBURG et al. 2007).

### **2.6.2 Die Rolle von Rapamycin in der Gefäßverletzung**

Bei Rapamycin handelt es sich um ein lipophiles Makrolidantibiotikum, welches als Fermentationsprodukt aus dem Bakterienstamm *Streptomyces hygroscopicus* 1975 in einer Bodenprobe der Osterinseln (Rapa Nui-Inseln) zum ersten Mal isoliert wurde (VEZINA et al. 1975). Neben dem Einsatz als Immunsuppressivum hat Rapamycin positive Effekte auf grundlegende biologische Eigenschaften (SEHGAL et al. 1975; POON et al. 1996; GALLO et al. 1999; EISEN et al. 2003). Der intrazelluläre Wirkmechanismus besteht in der Formung eines hemmenden Komplexes mit dem FK-Binding-Protein (FKBP) am Carboxy-terminalen Ende des mTOR-Proteins und führt zur Hemmung seiner Aktivität. Die Blockierung der mTOR-Raptor-Interaktion mittels des Rapamycin-FKBP-Komplexes führt zur verminderten Phosphorylierung und damit Deaktivierung der nachgeschalteten p70 S6 Kinase sowie zur verminderten Phosphorylierung und damit Aktivierung von 4EBP1. In beiden Fällen kommt es zur Translationsinhibierung und somit zur Hemmung von Zellwachstum und –proliferation (JOHNSON et al. 1994).

Rapamycin bzw. seine Analoge Sirolimus und Everolimus finden in der Humanmedizin als Medikamentenbeschichtungen von Stents Anwendung in koronaren Läsionen und zeigen ein gutes postinterventionelles Langzeitergebnis mit geringer Intimahyperplasie (MOSES et al. 2003; CASTRO et al. 2004; KASTRATI et al. 2005). Diese Ausschaltung von mTORC1 unterdrückt Wachstumsfaktoren sowie die cytokingesteuerte T-Zellvermehrung durch Hemmung des Zellzyklus von der G1-bis zur S-Phase. mTOR ist eine hochkonservierte Kinase mit Schlüsselfunktion, dessen Hemmung weitreichende Konsequenzen hat:





**Abbildung 6: Koordination des Zellzyklus und des Zellwachstums durch mTOR**

## **2.7. Atherosklerose und verletzungsinduzierte Intimahyperplasie beim Tier**

Im Gegensatz zum Menschen führt die Atherosklerose beim Tier selten zu klinisch relevanten Ereignissen. So werden atherosklerotische Veränderungen nur bei bestimmten Spezies, wie Schweinen, einigen Exoten, Vögeln und gelegentlich bei Karnivoren beobachtet (DAHME u. SCHRÖDER 1990). Nur bei alten Schweinen, Vögeln und Hunden kann es auf natürlichem Weg zu atherosklerotischen Veränderungen kommen (VAN VLEET u. FERRANS 1995). Wildschweine und Schweine neigen zu einer dem Menschen vergleichbaren Atheroskleroseform, die aber aufgrund der begrenzten Lebenszeit von Nutztieren kaum nachweisbar ist. Dabei sind vor allem die Abdominalaorta und die Zerebralarterien ab einem Alter von 10 Jahren betroffen. An Wildschweinen im Alter von 17- 20 Jahren können regelmäßig Arterienveränderungen nachgewiesen werden (KUNTZE 1995).

Zu experimentellen Zwecken kann bei Schweinen, Kaninchen, Mäusen und Hühnern durch cholesterinreiche Diät Atherosklerose induziert werden (REISER et al. 1959; KAKITA et al. 1972; PLUMP et al. 1992; FINKING u. HANKE 1997). So entwickeln beispielsweise Apolipoprotein-E-(ApoE)-Knockout-Mäuse nach cholesterinreicher Diät atherosklerotische Veränderungen (PLUMP et al. 1992).

In anderen Tiermodellen wird die pathologische Gefäßreaktion durch direkte Dilatation und Denudation mit einem Draht oder Ballonkatheter induziert. In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass sowohl die 129S1/SvIMJ-Inzuchtmaus als auch die Balb/c-Inzuchtmaus empfänglich für die verletzungsinduzierte Intimahyperplasie sind (HARMON et al. 2000; SATA et al. 2000; SMYTH et al. 2001; KUHEL et al. 2002). In dieser Studie wird das Femoralisverletzungsmodell nach Sata et al. genutzt (SATA et al. 2000). Dabei kommt es durch das Einführen des Drahtes zur Dilatation und Denudation des Gefäßes. Dieses Modell ähnelt der Ballonangioplastie und führt zur Apoptose von medialen Zellen und zur Bildung einer reproduzierbaren Intimahyperplasie aus glatten Muskelzellen (SATA et al. 2000). Der Vorteil dieses Verletzungsmodells gegenüber anderen Restenosemodellen liegt in der Aufrechterhaltung des luminalen Blutflusses (KUMAR u. LINDNER 1997; ROQUE et al. 2000).

Da durch dieses Modell die humane Erkrankung weitestgehend nachgeahmt wird, stabil und reproduzierbar ist und die hämodynamischen und biochemischen Verhältnisse erhalten bleiben, eignet es sich zur Studie der Pathophysiologie der Restenose und kann helfen, molekulare Signalwege zu identifizieren (CARMELIET et al. 1998; DOGGRELL u. BROWN 1998).

### **3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN**

#### **3.1 Zielsetzung des Gesamtprojektes**

Die Restenose nach perkutaner Angioplastie mit Stentimplantation stellt eines der zentralen Probleme der interventionellen Kardiologie dar. Vor diesem Hintergrund ist es das Ziel des Gesamtprojektes, zu einem besseren Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge der Intimahyperplasie nach Stentimplantation beizutragen. Vor allem auf molekularbiologischer Ebene ist es wichtig, zu neuen Erkenntnissen zu gelangen, um auf dieser Grundlage neue und eventuell bessere Therapieansätze entwickeln zu können. Ziel dieses Projektes ist es, die Rolle der Th1-Immunantwort nach Gefäßverletzung genauer zu verstehen und zentrale Regulationsmechanismen aufzudecken. Das Gesamtprojekt setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, mit denen einerseits die Hypothese überprüft werden und andererseits mögliche therapeutische Wege aufgezeigt werden sollen.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die einzelnen Untersuchungen in den verschiedenen Teilprojekten mit vergleichbaren morphometrischen, histologischen und immunhistologischen Methoden durchgeführt.

#### **3.2 Zielvorstellung und Aufbau der eigenen Studie**

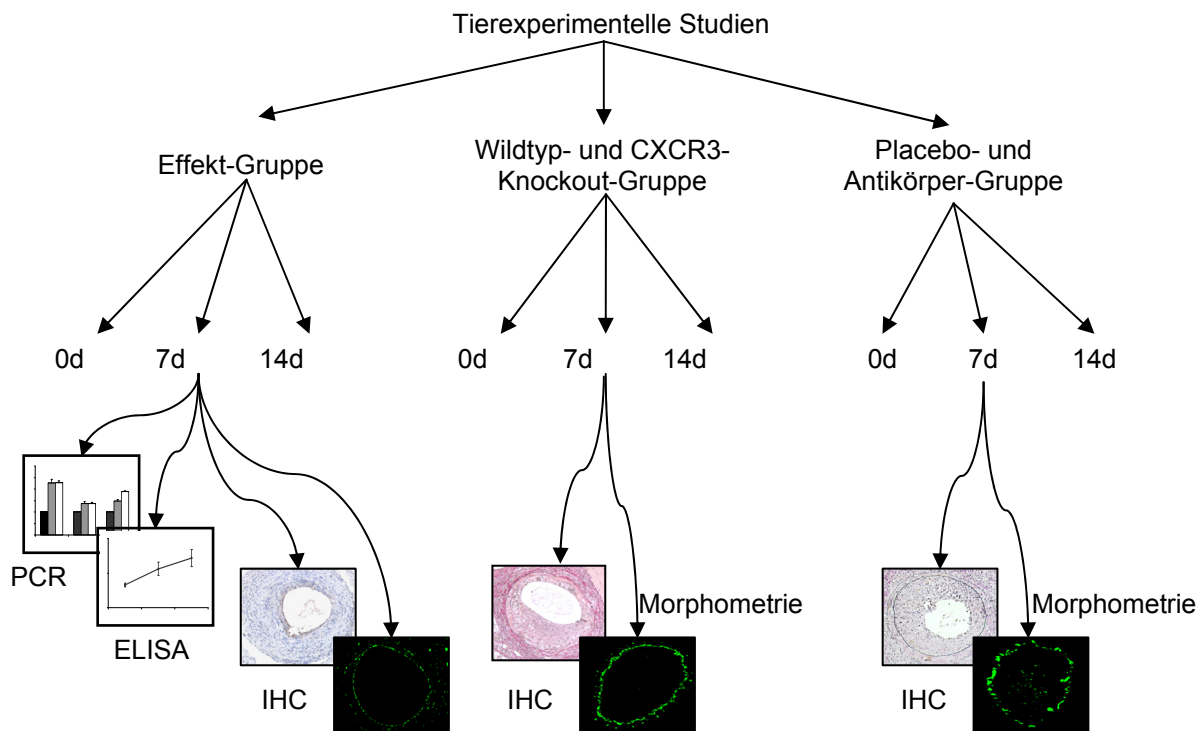
Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, die Bedeutung der CXCR3-IP10-MIG-Achse in der Intimahyperplasie im Mausmodell zu untersuchen. Aufgrund vorangegangener Ergebnisse, erscheint es naheliegend, dass das CXCR3-System nach der Gefäßverletzung eine entscheidende Rolle spielt. Aus diesem Grund sollte in einem ersten Projekt die Aufgabe des CXCR3-Systems nach Gefäßverletzung eingehend analysiert werden; mit Hilfe einer CXCR3-Knockout-Maus sollte ferner der Einfluss dieses Chemokinsystems auf die Intimahyperplasie, die Rekrutierung von Vorläufer- und Entzündungszellen, die Apoptose und die molekulare Signalwege definiert werden.

In einem zweiten Projekt wurden anschließend Mäuse mit einem polyklonalen Antikörper gegen IP10 und MIG behandelt, der femoralen Gefäßverletzung unterzogen und untersucht ob sich aus den Ergebnissen neue therapeutische Strategien zur Verminderung von Intimahyperplasie entwickeln lassen. In beiden

Projekten wurde die Restenosebildung durch ein murines Gefäßverletzungsmodell an der A. Femoralis der Maus induziert. Zu den Zeitpunkten 3, 7 und 14d nach der Gefäßverletzung wurden die Tiere geopfert und einer histologischen und morphometrischen Analyse unterzogen. Dabei dienten unverletzte Gefäße als Kontrollen. Nach dem Zeitpunkt 14d wurden die Gefäße zudem einer immunhistologischen Untersuchung auf unterschiedliche Gefäßmarker unterzogen.

Des Weiteren wurden mittels real-time RT-PCR und ELISA analysiert, wie sich das CXCR3 System im zeitlichen Verlauf nach Gefäßverletzung verhält.

Ein Überblick über den experimentellen Ablaufs dieses Projektes findet sich in nachfolgender Abbildung.



**Abbildung 7: Darstellung des tierexperimentellen Ablaufs der Studie**



### 3.3 Material und Methoden

#### 3.3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Bei den verwendeten Versuchstieren handelt es sich um 25–30g schwere Mäuse der Inzuchtstämme 129S1/SvIMJ (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) und BALB/c (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland). Die CXCR3-Knockout (KO, CXCR3<sup>-/-</sup>) und CXCR3-Wildtyp (WT, CXCR3<sup>+/-</sup>) Mäuse stammen freundlicherweise von Herrn Dr. Martin Bek (Universitätsklinikum Münster, Deutschland). Es handelt es sich um transgene Tiere, deren Genom eine gezielte Mutation trägt. In der zugrundeliegenden Genstrategie wurde das Exon2 des Rezeptors durch eine Neomycinkassette ersetzt und dadurch die Bildung des CXCR3 Rezeptors in den CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen verhindert (HANCOCK et al. 2000). Alle Tiere wurden mindestens 6 Generationen auf den genetischen Hintergrund von C57BL6/J-Mäusen zurückgekreuzt.

Die Haltungsbedingungen sind für alle Mäuse gleich; die Tiere sind in Makrolonkäfigen des Typs III bzw. IV untergebracht, in denen sie zu maximal acht bzw. fünfzehn Tieren auf Fasereinstreu (Altromin GmbH & Co KG, Lage-Lippe) gehalten werden. Wasser und Futter (Altromin-Haltungsfutter Maus/Ratte, Altromin GmbH & Co KG, Lage-Lippe) steht für die Tiere *ad libitum* zur Verfügung. Die Umgebungstemperatur liegt zwischen 19 und 24° C, die Luftfeuchtigkeit beträgt 55% ±5%. Das Beleuchtungsregime besteht aus einem zwölfstündigen Hell-Dunkelrhythmus, wobei in der Hellphase ca. 60 Lux im Käfig erreicht werden. In regelmäßigen Abständen werden zur Überwachung des Gesundheitsstatus serologische, bakteriologische und parasitologische Untersuchungen nach FELASA Richtlinien durchgeführt.

Alle Arbeiten mit den Tieren, wie zum Beispiel Operationen, Organentnahmen und Medikamenteneingaben, sowie die Aufstallung und Versorgung der Mäuse, finden im Zentrum für präklinische Forschung am Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München statt.

Das gesamte Tierversuchsvorhaben ist von der Regierung von Oberbayern gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes vom 25.05.1998, letzte Fassung vom 28. Dezember 2006, genehmigt (Reg.-Nr.: Tierversuchsantrag AZ 55.2-1-54-2531-36-06).

Die gewonnenen Proben werden histopathologisch im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München, in der Abteilung für Gefäßpathologie, aufbereitet. ELISAs, real-time RT-PCRs und Zellkulturversuche werden am Deutschen Herzzentrum in der Abteilung für Experimentelle Erwachsenenkardiologie der Technischen Universität München durchgeführt.

### **3.3.2 Versuchsplanung und Gruppeneinteilung**

Für die durchgeführten Studien wurden drei Versuchsgruppen gewählt. In der ersten Gruppe werden 129S1/SvIMJ-Mäuse dem Femoralisverletzungsmodell unterzogen und nach 7 bzw. 14 Tagen geopfert und die Gefäße histopathologisch aufbereitet. Unverletzte Gefäße dienen hier als Kontrollen.

In der zweiten Gruppe werden die Reaktionen der CXCR3-Knockout-Mäuse auf die Gefäßverletzung mit den Reaktionen der CXCR3-Wildtyp-Mäuse nach 3, 7 bzw. 14 Tagen verglichen. Auch hier dienen unverletzte Gefäße als Kontrollen zu den verletzten Gefäßen.

In der dritten Gruppe soll dann die pharmakologische Blockierung von CXCR3 untersucht werden. Dafür werden 129S1/SvIMJ-Mäuse auf der einen Seite mit einem polyklonalen Antikörpercocktail gegen die beiden CXCR3-Liganden IP10 und MIG behandelt; auf der anderen Seite werden Kontrollmäuse mit einem Placebo (Normal Rabbit Serum, NRS) behandelt. Beide Tiergruppen werden dann wieder dem Gefäßverletzungsmodell unterzogen und nach 3, 7 bzw. 14 Tage geopfert. Auch hier dienen unverletzte Gefäße als 0-Tage-Kontrollen.

#### **3.3.2.1 Effekt-Gruppe**

Die Effekt-Gruppe (EG) besteht aus unoperierten und operierten Gefäßen von unbehandelten 129S1/SvIMJ-Mäusen. Dabei liegen die Zeitpunkte der Opferung bei 7 bzw. 14 Tagen. Anhand der Effekt-Gruppe soll die Rolle von CXCR3 bei der Gefäßverletzung geklärt werden. Zusätzlich soll der zeitlichen Verlauf und die zelluläre Zusammensetzung unter Berücksichtigung des CXCR3-Einflusses dargestellt werden. In dieser Gruppe werden die Gefäße sowohl durch real-time RT-PCR als auch durch immunhistologische Färbungen analysiert. Zusätzlich wird die

Serumkonzentration der beiden CXCR3 Liganden IP10 und MIG durch ELISA bestimmt.

### 3.3.2.2 Wildtyp- und CXCR3-Knockout-Gruppe

#### 3.3.2.2.1 Die Wildtyp-Gruppe (WT)

Die Wildtyp-Gruppe (WT) besteht aus den genetisch nicht manipulierten und unbehandelten BALB/c Mäusen, die einer bilateralen Gefäßverletzung der A. Femoralis unterzogen werden. Sie werden nach den unterschiedlichen Zeitpunkten der Probengewinnung in vier Untergruppen (0d<sub>WT</sub>-Gruppe, 3d<sub>WT</sub>-Gruppe, 7d<sub>WT</sub>-Gruppe, 14d<sub>WT</sub>-Gruppe) eingeteilt.

Nach der Euthanasierung werden die Gefäße für die histomorphometrische und immunhistologische Untersuchung in Formalin fixiert.

#### 3.3.2.2.2 CXCR3-Knockout-Gruppe

In der CXCR-3-Knockout-Gruppe (CXCR3<sup>-/-</sup>) sind alle Mäuse genetisch verändert, indem im Exon2 des CXCR3 Rezeptors 800bp deletiert und durch eine Neomycinkassette ersetzt worden sind (HANCOCK et al. 2000).

CXCR3

Wildtyp:



CXCR3 KnockOut:



**Abbildung 8: Wildtyp (WT)-Allele, Targetvektor und mutiertes Allele des CXCR3-Gens. Das Wildtyp-Gen enthält das Exon 2 des CXCR3-Rezeptors. In dem**

mutierten Allele des CXCR3-Gens ist der größte Anteil des Exon 2 (800 bp) gelöscht und durch eine Neomycin-Kassette (Neo), die durch den Promotor phosphoglycerate (PgK) gesteuert wird, ersetzt (gelbes Rechteck) (HANCOCK et al., 2000).

Auch an dieser Gruppe wird eine bilaterale Gefäßverletzung der A. Femoralis durchgeführt. Wie die Wildtyp-Gruppe wird die CXCR-3-Knockout-Gruppe in vier Untergruppen (0d<sub>CXCR3-/-</sub>-Gruppe, 3d<sub>CXCR3-/-</sub>-Gruppe, 7d<sub>CXCR3-/-</sub>-Gruppe, 14d<sub>CXCR3-/-</sub>-Gruppe) unterteilt.

### 3.3.2.3 Placebo- und Antikörper-Gruppe

#### 3.3.2.3.1 Placebo-Gruppe

Bei den Placebo-Mäusen (Placebo) handelt es sich um 129S1/SvIMJ die täglich mit normalen Kaninchenseruminjektionen (0,6mg) subkutan behandelt werden. Die Behandlung wird 2 Tage vor der Femoralisverletzung gestartet und bis zum Tag der Opferung aufrechterhalten. Wie die zwei vorangegangenen Gruppen wird auch die Placebo-Gruppe in vier Untergruppen (0d<sub>Placebo</sub>-Gruppe, 3d<sub>Placebo</sub>-Gruppe, 7d<sub>Placebo</sub>-Gruppe, 14d<sub>Placebo</sub>-Gruppe) aufgeteilt.

#### 3.3.2.3.2 Antikörper-Gruppe

Die Antikörper-Gruppe (anti-IP10/ anti-MIG pAb) besteht aus 129S1/SvIMJ-Mäusen, die mit einem Antikörpercocktail gegen IP10 (0,3mg) und MIG (0,3mg) behandelt werden. Die Tiere erhalten zwei Tage vor der Femoralisverletzung bis einschließlich dem Tag der Opferung diese Dosis subkutan injiziert. Die Antikörper stammen von Bio-Synthesis (USA) und richten sich gegen folgende Peptidsequenzen:

<b><u>IP10:</u></b>	NH <sub>2</sub> -CIHIDDGPVRMRAIGK-OH
<b><u>MIG:</u></b>	NH <sub>2</sub> -CISTSRGTIHYKSLKDLKQFAPS-OH

Tabelle 1: Peptidsequenzen von IP10 und MIG

Die Verabreichung der Antikörper erfolgt in Anlehnung an Arai et al (ARAI et al. 2002). Wie die vorherigen Gruppen wird auch diese Gruppe in vier Subgruppen (0d<sub>anti-IP10/anti-MIG pAb</sub>-Gruppe, 3d<sub>anti-IP10/anti-MIG pAb</sub> -Gruppe, 7d<sub>anti-IP10/anti-MIG pAb</sub> -Gruppe, 14d<sub>anti-IP10/anti-MIG pAb</sub> -Gruppe) gegliedert.

Versuchsplanung					
Tierexperimentelle Studien			In vitro Untersuchungen		
Effekt-Gruppe	Wildtyp- und CXCR3-Knockout-Gruppe	Placebo- und Antikörper-Gruppe	Monozyten	Endothelzellen	Glatte Muskelzellen
Femoralisverletzung			Stimulation mit IP10		
0, 7 und 14 d	0, 7 und 14 d	0, 7 und 14 d	± Sirolimus/ Everolimus		
real-time RT-PCR, ELISA, Immunhistologie, Doppelimmun-fluoreszenz	Histo-Morphometrie, Immunhistologie, Immun-fluoreszenz	Histo-Morphometrie, Immunhistologie, Immun-fluoreszenz	ROS- und Apoptose-messung	ROS- und Apoptose-messung	ROS- und Apoptose-messung

**Tabelle 2: Versuchsplan und Gruppeneinteilung**

### 3.3.3 Das Femoralisverletzungsmodell bei der Maus

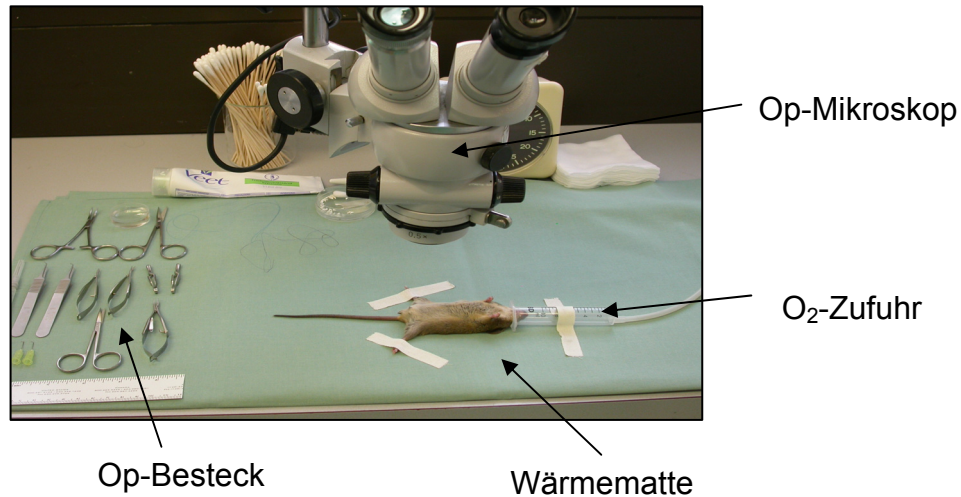
#### 3.3.3.1 Präoperative Versorgung

Um eine ausreichende und kontinuierliche postoperative Analgesie zu gewährleisten, wird jedem Tier vor der Narkose 1-2 Tropfen Metamizol-Natrium (Novaminsulfon-ratiopharm®-Tropfen, Ratiopharm, Ulm) oral verabreicht.

#### 3.3.3.2 Anästhesie und Operationstechnik

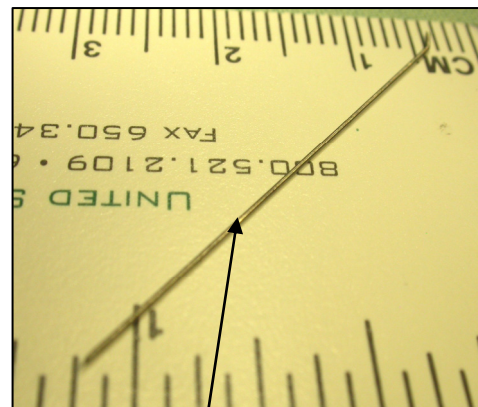
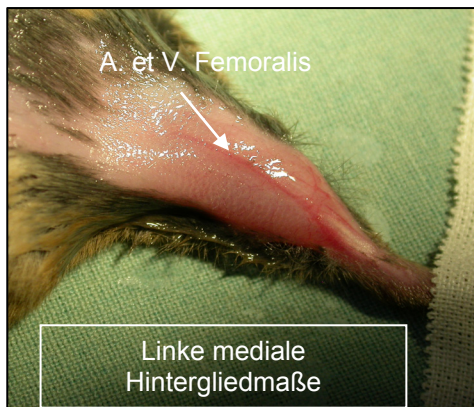
Die Mäuse werden durch eine Injektions-Kombinations-Anästhesie in einen operationsfähigen Zustand gebracht (Stadium III/2, Chirurgische Toleranz). Dabei werden die Wirkstoffe Medetomidin (Domitor®, Pfizer, Deutschland; 0,5mg/kg KG; Hypnose), Midazolam (Midazolam®, Ratiopharm, Deutschland; 5,0mg/kg KG; Muskelrelaxation) und Fentanyl (Fentanyl®, Curamed Pharma, Deutschland;

0,05mg/kg KG; Analgesie) im Verhältnis 0,5:1,0:1,0 gemischt. Die Einzeldosis für eine Maus mit dem Gewicht von 30,0g beträgt 0,1ml und wird intraperitoneal appliziert. Nach dem Verlust des Zwischenzehenreflexes wird das Tier in Rückenlage auf einer durch ein Op-Tuch abgedeckten Wärmematte mit den Hintergliedmaßen fixiert.



**Abbildung 9: Operationsvorbereitung und Lagerung**

Die Augen werden mit Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Roche Consumer Health, Schweiz) vor dem Austrocknen geschützt und das Tier über eine Nasenkammer mit 200-400ml O<sub>2</sub>/min versorgt. Für die Enthaarung an den beiden Innenseiten der Oberschenkel und am Bauch wird Enthaarungscreme (Plica®, GlaxoSmithKline, Bühl) verwendet. Eine anschließende Desinfektion der Haut findet mit Cutasept-F® (Bode, Hamburg) statt.

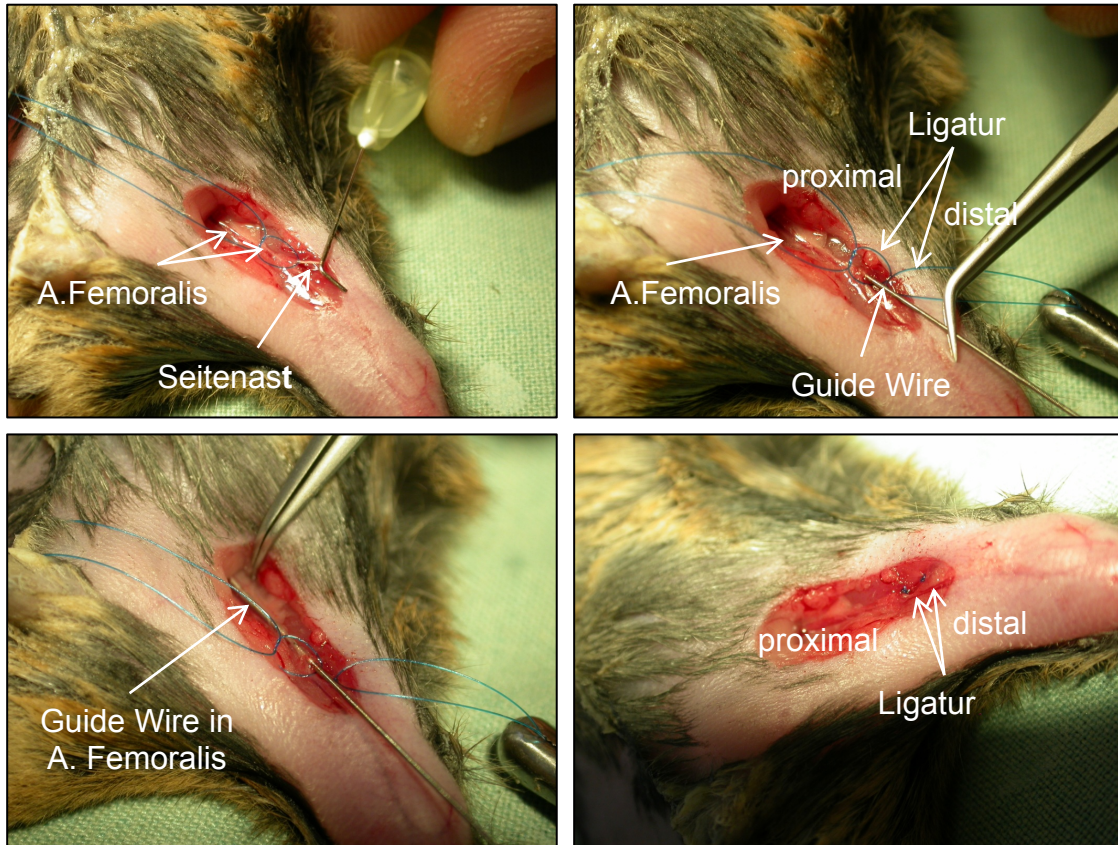


### **Abbildung 10: A. et V. Femoralis (a) und Guide Wire (b)**

Die gesamte Operation findet unter einem Mikroskop (Carl Zeiss, Deutschland) mit mikrochirurgischen Instrumenten (FST, Heidelberg) statt; die Operationstechnik richtet sich nach Sata et al. (SATA et al. 2000).

Nachdem die chirurgische Toleranz durch Testen des Zwischenzehenreflex an den Hintergliedmaßen überprüft wurde, wird der Hautschnitt medial an der Innenseite des Oberschenkels durchgeführt. Dabei wird die Haut auf einer Länge von ca. einem Zentimeter zwischen Kniegelenk und Leiste eröffnet. Nach stumpfem Durchtrennen des Fettgewebes liegen A., V., und N. Femoralis frei. Nun wird der N. Femoralis proximal, an dem Punkt, wo er sich von A. und V. Femoralis trennt, isoliert; die beiden Gefäße werden zeitweilig mit einem Faden (USP 8/0 Prolene<sup>®</sup>, Ethicon, Norderstedt) umschlungen und ohne Zug liegen gelassen. Damit wird später eine temporäre Ischämie erzeugt, um Blutungen beim Ziehen des Drahtes zu vermeiden. Im Bereich des Kniegelenkes wird zwischen dem M. rectus femoris und M. vatus mediales in die Tiefe präpariert und ein Muskelast der A. und V. Femoralis, bestehend aus Arterie und Vene, freigelegt. Nachdem man die Arterie des Muskelastes von der Vene getrennt hat, wird die Arterie distal permanent ligiert (USP 8/0 Prolene<sup>®</sup>, Ethicon, Norderstedt). Proximal, an dem Zusammenschluss von Muskelast und A. Femoralis, wird der Abgang mit einem Faden umschlungen (USP 8/0 Prolene<sup>®</sup>, Ethicon, Norderstedt) und durch leichten Zug temporär ligiert. Nun wird zwischen der permanenten und der temporären Ligation der Muskelast mit einer Gefäßschere („Mini Vannas“, FST, Heidelberg) eröffnet und der Draht („standard-guidewire“ für Herzkatheter, Durchmesser: 0,014 Inch) über diesen Seitenast, während des Lösens der proximalen temporären Ligatur, ca. 5mm in die A. Femoralis geschoben.

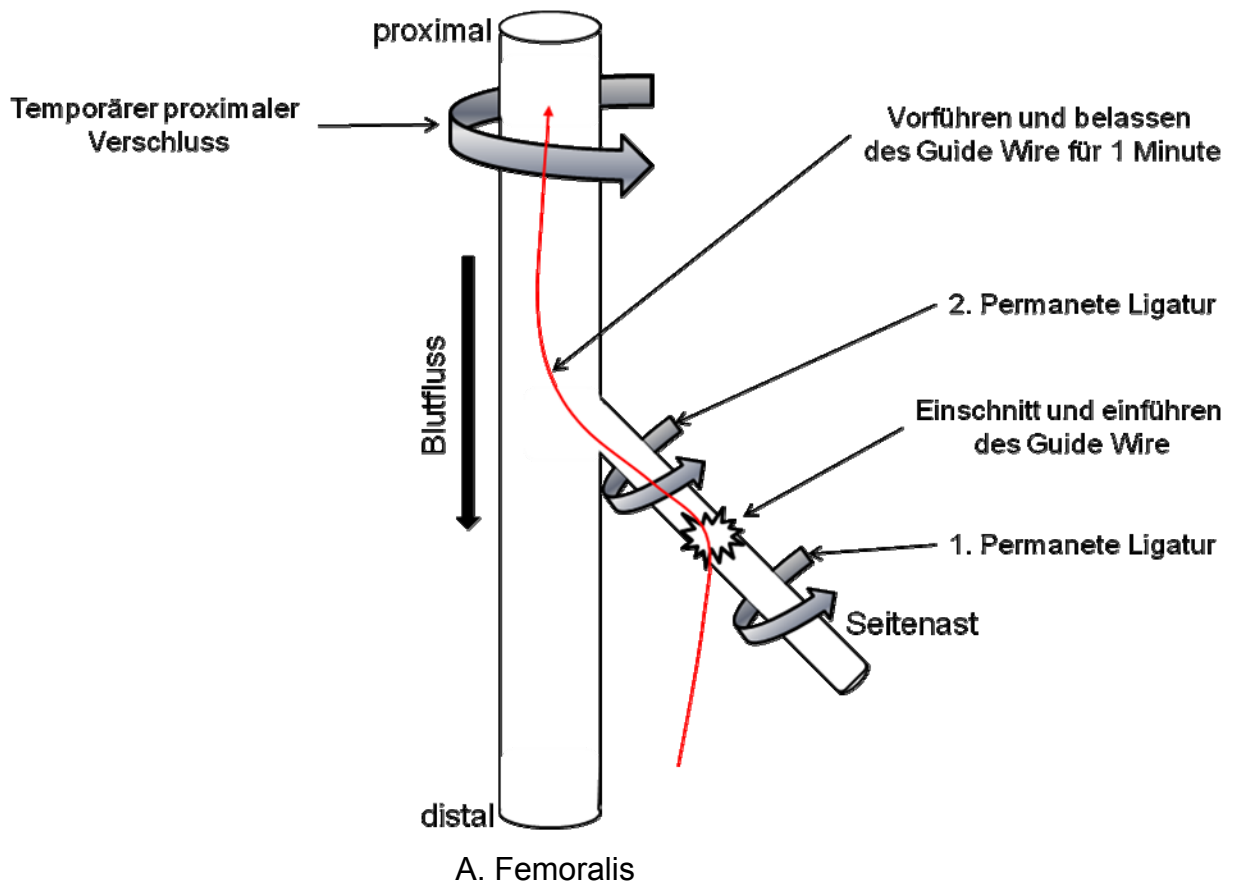




**Abbildung 11: In vivo Darstellung des Operationsablaufs**

Nach exakt 60 Sekunden wird der Draht vorsichtig entfernt und der Seitenast auch proximal verschlossen (USP 8/0 Prolene®, Ethicon, Norderstedt). Danach wird der Blutfluss in der A. und V. Femoralis wiederhergestellt. Anschließend erfolgt der Wundverschluss mit 3-4 U-Nähten (USP 6/0 Vicryl®, Ethicon, Norderstedt).





**Abbildung 12: Schematische Darstellung des Femoralisverletzungsmodell**

Daraufhin wird die Narkose durch subkutane Kombinationsinjektion der Wirkstoffe Atipamezol (Antisedan®; 2,5mg/kg KG; Pfizer Deutschland) und Flumazenil (Anexate®; 0,5mg/kg KG; Roche Schweiz) antagonisiert. Die Tiere wachen nach 1-2 Minuten wieder aus der Narkose auf und werden an einem ruhigen und warmen Ort unter Beobachtung gestellt.

### **3.3.3.3 Postoperative Versorgung**

Da die Schmerzen nach dem operativen Eingriff als gering eingeschätzt werden, ist die präoperative Eingabe von Metamizol-Natrium (Novaminsulfon-ratiopharm®-Tropfen, Ratiopharm, Ulm) als ausreichend anzusehen. Im weiteren Verlauf werden das Allgemeinbefinden und die Wunden in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

### 3.3.4 Euthanasie, Perfusion und Probengewinnung

Zur Euthanasie werden die Mäuse durch i.p. Applikation von Medetomidin (Domitor<sup>®</sup>, Pfizer, Deutschland; 0,5mg/kg KG; ), Midazolam (Midazolam<sup>®</sup>, Ratiopharm, Deutschland; 5,0mg/kg KG) und Fentanyl (Fentanyl<sup>®</sup>, Curamed Pharma, Deutschland; 0,05mg/kg KG) in Narkose gelegt und sobald das Toleranzstadium erreicht ist, durch die i.p. Gabe von Pentobarbital (Narkoren<sup>®</sup>, Merial, Deutschland; 300mg/kg KG) getötet. Im Anschluss werden die Tiere auf Eis gelagert, um postmortale Reaktionen zu minimieren.

Nachdem die Tiere in Rückenlage gebracht worden sind, wird der Thorax mit einem Hautschnitt auf Höhe des Sternums eröffnet und entlang des Rippenbogens, im Bereich der Knochen-Knorpel-Grenze, durchtrennt. Das Brustbein wird mit einer Klemme erfasst und nach oben umgeklappt. Nachfolgend wird das rechte Herzohr mit einem Scherenschnitt eröffnet und der linken Ventrikel mit einer Mosquito-Kanüle eingestochen, um ihn mit ca. 15-20ml eiskalter Ringer-Lösung zu spülen. Dieser Vorgang wird bis zur Blutleere der Leber weitergeführt. Nach Umlagerung des Tieres und Fixierung der Hintergliedmaßen wird an der Innenfläche des Hinterbeines, parallel zur Operationsnarbe, die Haut mit einem Schnitt eröffnet. Man präpariert A. Femoralis, V. Femoralis und N. Femoralis vom Bindegewebe frei und entfernt den N. Femoralis. Anschließend werden ca. 5mm des Gefäßbündels, beginnend distal der proximalen Ligatur des Seitenastes, entnommen und für die histomorphometrische Analyse gestreckt auf ein Filterpapier gelagert. Diese Aufbereitung der Gefäßstücke ist notwendig, um ein Abknicken bzw. Absinken bei der folgenden Fixierung in 4%iger Formalinlösung zu verhindern.

### 3.3.5 Probenaufarbeitung für histomorphometrische Analyse

#### 3.3.5.1 Immersionsfixierung

Nach der Gewinnung des Gefäßpaares bleibt es zur Immersionsfixierung für ca. 24 Stunden in 4%iger gepufferter Formalinlösung. Danach wird die Probe aus dem Eppendorfgefäß entnommen und in die Plastikkassette für den Einbettautomat überführt.

### 3.3.5.2 Fixierung, Entwässerung und Vorparaffinierung

Die Fixierung, Entwässerung und Vorparaffinierung findet über Nacht im Einbettautomat (Shandon Pathcentre®, Thermo Electron GmbH Deutschland) statt. Dabei wird die Probe zunächst in 4%igem Formalin fixiert (ca. 2h), anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%iges Ethanol, 96%iges Ethanol, 100%iges Isopropanol, insgesamt ca. 5,5h) stufenweise entwässert; durch Xylol (ca. 2h) wird der Alkohol schließlich verdrängt. Die Vorparaffinierung wird in Paraffinbädern mit 4%igem Formalin (ca. 2h) durchgeführt. Bis zur Einbettung in flüssiges Paraffin verbleibt die Probe bei 60°C im Brutschrank.

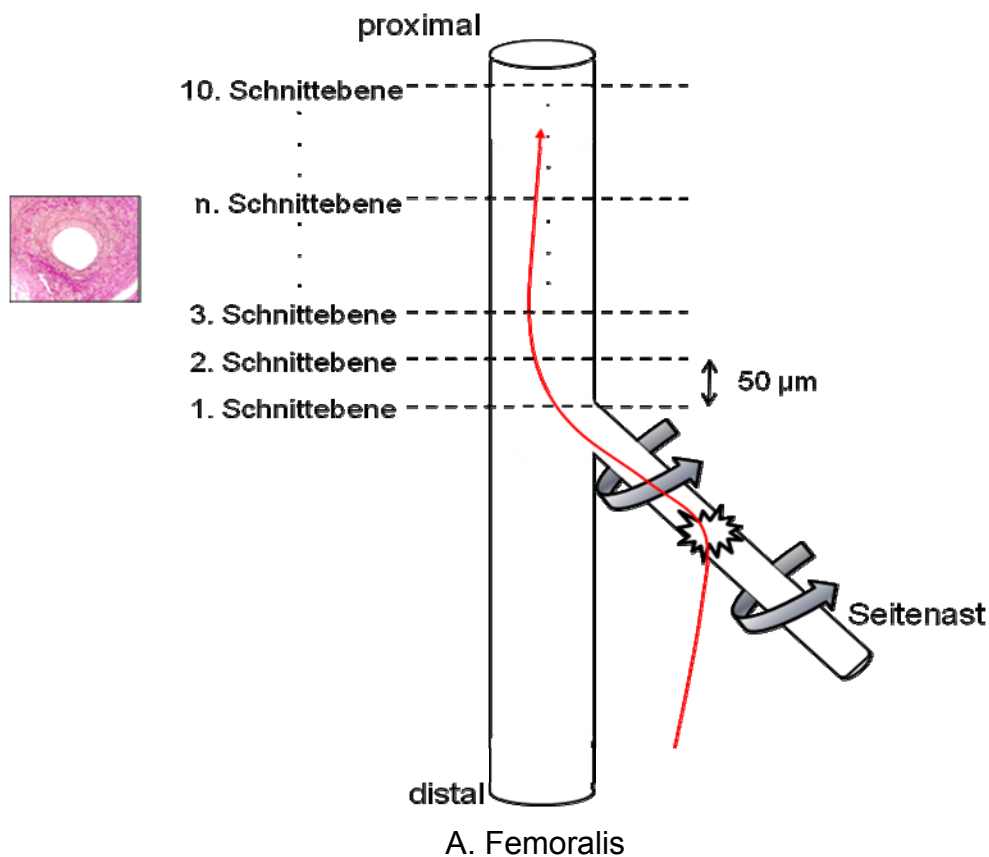
### 3.3.5.3 Einbettung in flüssiges Paraffin

An einem Paraffinspendeautomat (TBS Paraffin Embedding System: Thermal Unit, Cool Unit, Dispenser Unit, Medite Medizintechnik, Burgdorf) erfolgt das Einbetten in flüssiges Paraffin und das Härten des Paraffinblockes. Um eine optimale Anfertigung der Paraffinschnitte zu erhalten, wird das Gefäß gestreckt und senkrecht, mit dem Knoten der proximalen Ligatur des Seitenastes nach unten, eingebettet.

### 3.3.5.4 Anfertigen der Paraffinschnitte

Je Gefäß werden 10 Schnittebenen im Abstand von 50µm für die morphometrische Auswertung angefertigt. Für die immunhistochemischen Färbungen werden zusätzliche Schnitte zwischen der dritten und vierten Ebene erstellt. Die Paraffinschnitte sind 2µm dick und werden am Rotationsmikrotom (Mikrom GmbH, Walldorf) angefertigt. Der Ausgangspunkt bei jedem Gefäß liegt oberhalb der proximalen Ligatur des Seitenastes. Pro gewählter Schnittebene werden zwei Objektträger (Menzel Gläser Deutschland) mit je zwei Paraffinschnitten hergestellt. Die Schnitte für die immunhistochemische Analyse werden auf SuperFrost®Plus Objektträger (Menzel-Gläser, Deutschland) im Wasserbad aufgezogen.

Um die Schnitte für die Färbung vorzubereiten, werden sie für 20 Minuten bei ca. 60°C im Brutschrank entparaffiniert.



**Abbildung 13: Schematische Darstellung der histomorphometrischen Auswertung**

### 3.3.5.5 Färben der Paraffinschnitte

Die Färbungen für die morphometrische Auswertung werden am Färbeautomat (Tissue Stainer TST 30, Medite Medizintechnik, Burgdorf) durchgeführt. Als Standardfärbungen werden Hämatoxylin-Eosinfärbung (H.E.) und Elastica-van-Gieson (E.-v.-G.) angefertigt. Die H.E.-Färbung dient als Übersichtsdarstellung, während mit der E.-v.-G. Färbung werden zusätzlich die kollagenen Fasern der Lamina elastica externa und Lamina elastica interna hervorgehoben werden.

### 3.3.6 Histomorphometrische Analyse

Zur histomorphometrischen Analyse werden jeweils die 10 Ebenen eines Gefäßes genutzt. Die erste Ebene bildet der Schnitt, der direkt dem Seitenast folgt, über den der Draht in die A. Femoralis geschoben wird. Jede Schnittebene wird unter

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

dem Mikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Carl Zeiss Deutschland) mit der 10fachen Vergrößerung fotografiert und digital als tif-Datei gespeichert. Anschließend werden die Schnittebenen mit der Software ScionImagebeta 4.0 (Scion Corporation, Maryland, USA) ausgemessen. Dabei werden folgende Parameter erhoben:

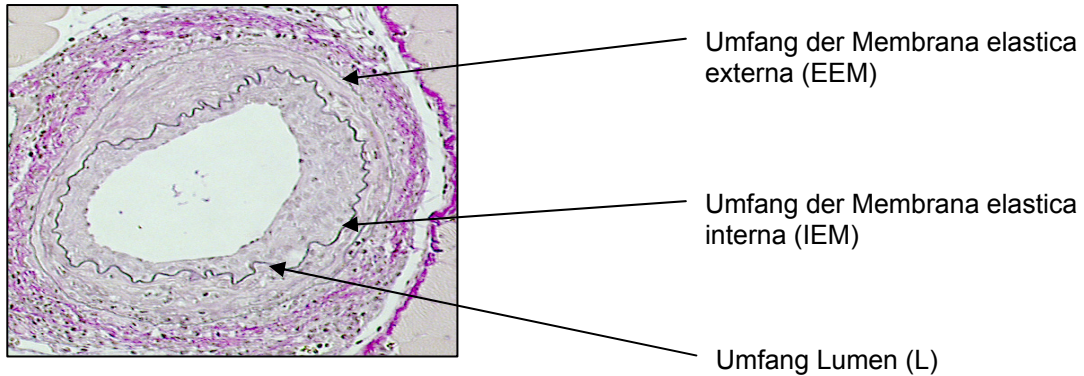
1. Umfang und Fläche des Lumens (L).
2. Umfang und Fläche des Bereiches innerhalb der Lamina elastica interna (IEM, internal elastica membrane).
3. Umfang und Fläche des Bereiches innerhalb der Lamina elastica externa (EEM, external elastica membrane).

**Tabelle 3: Morphometrisch erhobene Parameter**

Mit Hilfe dieser Werte werden dann folgende Parameter berechnet:

1. Fläche Lumen ( $\mu\text{m}^2$ ) und % Lumenverlust.
2. Fläche der Intimahyperplasie ( $\mu\text{m}^2$ )
3. Mediafläche ( $\mu\text{m}^2$ )

**Tabelle 4: Berechnete Parameter**



**Abbildung 14: Morphometrische Ausmessung der A. Femoralis nach Gefäßverletzung; Das ScionImage Programm berechnet den Umfang in  $\mu\text{m}$ . Folgende Parameter werden dann daraus berechnet:**

1. Fläche Intimahyperplasie
2. Fläche Media
3. Lumen und % Lumenverlust
4. Intima/Media Ratio

### 3.3.7 Immunhistologische Analyse

Zur Untersuchung der zellulären und molekularen Zusammensetzung auf Proteinebene in den verletzten Gefäßabschnitten werden immunhistochemische Färbungen auf Inflammation, Apoptose, Reendothelialisierung und Signaltransduktion durchgeführt. Alle Färbungen wurden zuerst an Positivkontrollen etabliert. Dazu dient ein Multi-Tissue-Block, auf dem verschieden Organe wie Leber, Niere, Milz, Darm, Lunge und Haut von unbehandelten, genetisch nicht veränderten Tieren spezifisch angefärbt und analysiert werden können.

#### 3.3.7.1 Allgemeine Vorbehandlung der Schnitte

Alle Proben für die immunhistologische Analyse werden auf silanisierte Objektträger (SuperFrost® Plus Objektträger, Menzel-Gläser, Deutschland) aufgetragen, um ein Abschwimmen während des Färbeprozesses zu verhindern. Die Schnitte werden dann für 24h im Brutschrank bei 56°C getrocknet.

##### 3.3.7.1.1 Entparaffinierung

Die Entparaffinierung der Schnitte findet in einer absteigenden Alkoholreihe statt. Dafür müssen die Schnitte 2 mal 10 Minuten in Xylol getaucht werden.

Anschließend werden die Gefäßschnitte 2 mal 5 Minuten in Isopropylalkohol und dann jeweils 5 Minuten in 96% Ethanol und 70% Ethanol gebadet. Am Ende dieser Reihe kommen die Schnitte für 5 Minuten in dH<sub>2</sub>O.

### **3.3.7.1.2 Antigendemaskierung durch Hitzedenaturierung**

Zur besseren Darstellung der Antigene werden alle Gefäßschnitte unter der Einwirkung von Hitze demaskiert. Dadurch werden die durch das Formalin gebildeten Aldehydvernetzungen gelöst.

Zu diesem Zweck werden die Schnitte in Citratpuffer (10mM, pH 6,0) 7 Minuten in einem Druckkochtopf gekocht und nach dem anschließenden Abkühlen 3-mal mit Trispufferlösung (10mM, pH 7,6) gewaschen.

### **3.3.7.1.3 Blockierung endogener Enzyme**

Mittels der Labeled Strept-Avidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode) werden vorhandene endogene Enzyme durch Behandlung mit 3% Wasserstoffperoxid für 15 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Dadurch werden unspezifische Hintergrundfärbungen minimiert. Anschließend werden die Schnitte 3-mal mit Trispufferlösung (10mM, pH 7,6) gewaschen.

### **3.3.7.2 Färbungen mit der Labeled Strept-Avidin-Biotin-Methode (LSAB)**

Dieses Prinzip beruht auf der Affinität von Avidin zu Biotin. Zum Einsatz kommt ein biotinylierter Zweitantikörper, auf den direkt ein mit einem Enzym gebundenes Avidin aufgetragen wird.

Der Einsatz des LSAB-Systems ist derzeit eine der spezifischsten und wegen seiner einfachen Handhabung die am meisten bevorzugte Methode. Bei dieser Methode werden die Schnitte zuerst mit dem Primärantikörper für 1h inkubiert. Darauf folgt nach einem Waschschriff mit Trispufferlösung (10mM, pH 7,6) die Zugabe des tierartspezifischen biotinylierten Zweitantikörpers für 30 Minuten. In einem weiteren Schritt erfolgt die Inkubation mit dem Streptavidin-Enzymkonjugat für 30 Minuten. Die Färbung wird vervollständigt mit der Zugabe des Substrates 3,3-Diaminobenzidin

(DAB) für 5-10 Minuten. Zweitantikörper, Streptavidin-Enzymkonjugat und DAB sind aus dem Dako ChemMate Detection Kit, LSAB (Dako, Deutschland) entnommen.

Um einen besseren Kontrast zum Gewebe zu erhalten, werden die Schnitte anschließend noch für 60 Sekunden mit Hämalauin gegengefärbt.

Die Schnitte werden danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Deckgläsern eingedeckelt.

Folgende Primärantikörper werden mit dieser Methode detektiert:

<u>LSAB Methode, Primärantikörper</u>
1. CD45 (BD Bioscience, USA)
2. CD3 (Serotec, Deutschland)
3. c-kit (Santa Cruz, USA)
4. EMAP-II (M. A. Clauss, Indianapolis, USA)
5. Caspaase-3 (R&D Systems, USA)

**Tabelle 5: Primärantikörper LSAB-Methode**

### **3.3.7.3 Färbungen mit der Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline-Phosphatase-Methode (APAAP)**

Das Prinzip dieser Färbemethode besteht aus einem monoklonalen Maus-IgG-Antikörper gegen alkalische Phosphatase, welcher spezifisch mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert ist. Nach der Inkubation der Primärantikörper für 1h und der Inkubation des murinen Zweitantikörper für 30 Minuten wird dieser mit Hilfe der alkalischen Phosphatase detektiert (Dako Real Detection System. APAAP, Dako, Deutschland). Der Vorteil dieser Methode ist es, dass man störende Einflüsse der endogenen Peroxidase oder des endogenen Biotins umgeht.

Die Schnitte werden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Deckgläsern eingedeckelt.

Mit dieser Methode werden folgende Primärantikörper detektiert:



### Apaap Methode, Primärantikörper

1.  $\alpha$ -SM actin (Dako, Deutschland)
2. SDF1- $\alpha$  (R&D Systems, USA)

**Tabelle 6: Primärantikörper Apaap-Methode**

### 3.3.7.4 Immunfluoreszenz und Doppelimmunfluoreszenz

Als weiteres immunhistochemisches Nachweisverfahren wird in dieser Studie die indirekte Immunfluoreszenz-Technik verwendet. Ein erster spezifischer, unkonjugierter Primärantikörper wird für 1h mit dem Präparat inkubiert, um an das gesuchte Zielprotein zu binden. Anschließend wählt man einen mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper, welcher im Fluoreszenzmikroskop angeregt wird, so dass ein Farbsignal sichtbar wird. Nach der Zugabe des Sekundärantikörpers darf möglichst kein Licht mehr auf das Präparat fallen.

Zur Darstellung der Kerne werden die Schnitte mit DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid, SIGMA, USA) für 60 Sekunden gegengefärbt. Bei DAPI handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der an zelluläre DNA bindet. DAPI kann bei einem Absorptionsmaximum von  $\lambda=340$  nm und einem Emissionsmaximum von  $\lambda=488$  nm in einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Anschließend werden die Schnitte mit Mounting Medium (Vector Laboratories) eingedeckelt.

Diese Methode wurde für die folgenden Primärantikörper genutzt:

### Immunfluoreszenz, Primärantikörper

1.  $\alpha$ -SM actin (Dako, Deutschland)
2. c-kit (Santa Cruz, USA)
3. CD3 (Serotec, Deutschland)
4. CD31 (Santa Cruz, USA)
5. CXCR3 (R&D Systems, USA)
6. mTOR (Santa Cruz, USA)
7. p\*p70 S6k (Invitrogen, USA)

**Tabelle 7: Primärantikörper Immunfluoreszenz**

Als fluorchromkonjugierte Zweitantikörper wurden folgende Antikörper genutzt:

<u>Fluorchromkonjugierte Zweitantikörper</u>
1. Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA); Exzitation $\lambda$ =495 nm; Emission $\lambda$ =519 nm; grün
2. Alexa Fluor 568 (Invitrogen, USA); Exzitation $\lambda$ =578 nm; Emission $\lambda$ =603 nm; rot

**Tabelle 8: Fluorchromkonjugierte Zweitantikörper**

Zur Doppelmarkierung der Präparate werden zwei verschiedene Antigene mittels zwei unterschiedlicher Sekundärantikörper nachgewiesen. Damit die beiden Antigene voneinander abzugrenzen sind, werden zwei Farben mit einem guten Farbkontrast gewählt (grün/rot). Um mögliche Kreuzreaktivitäten zu vermeiden, ist die Herkunft der Primärantikörper bedeutsam. Die Primärantikörper sollten aus zwei verschiedenen Tierspezies stammen, um diese Antikörper später dann besser mit dem tierartspezifischen fluoreszenzkonjugierten Zweitantikörper detektieren zu können. Folgende Primärantikörper werden kombiniert:

<u>Doppelimmunfluoreszenz, Primärantikörper</u>
1. CXCR3 (grün, R&D Systems) mit c-kit (rot, Santa Cruz, USA)
2. CXCR3 (grün, R&D Systems) mit CD3 (rot, Serotec, Deutschland)
3. CXCR3 (grün, R&D Systems) mit CD31 (rot, Santa Cruz, USA)
4. CXCR3 (grün, R&D Systems) mit $\alpha$ -SM actin (rot, Dako, Deutschland)

**Tabelle 9: Primärantikörper Doppelimmunfluoreszenz**

Als Kernfärbung wird, wie auch bei der einfachen indirekten Immunfluoreszenz, die blaue DAPI-Färbung genutzt.

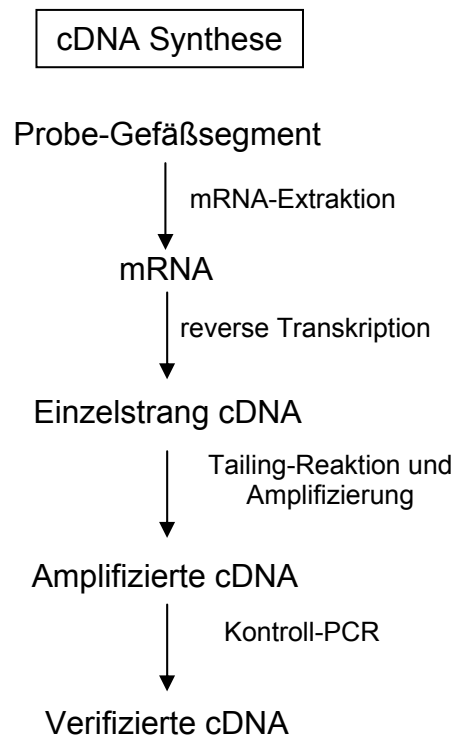
### 3.3.7.5 Apoptosedarstellung mittels TUNEL-Technologie

Bei Apoptose handelt es sich um einen programmierten Zelltod, der in dem Gefäßverletzungsmodell durch eine Vielzahl von mechanischen und biologischen Noxen sowie über mehrere Rezeptorkaskaden hervorgerufen wird. Alle Apoptose-Induktionen enden jedoch gleich. Sie stellen sich morphologisch als Kondensation und Fragmentation des Zellkerns und biochemisch mit der Spaltung von Chromatin durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Endonukleasen dar. Diese Chromatin-Spaltung führt zunächst zu größeren (50-300 Kilobasen) und schließlich zu kleineren (180-200 Basenpaare) Fragmenten. Es können sowohl doppelsträngige niedermolekulare DNA-Fragmente auftreten als auch Einzelstrangbrüche in hochmolekularer DNA. TUNEL (Terminale-Deoxynucleotidyl-Transferase) (TdT)-mediated deoxyuridinetriphosphat (dUTP) nick end-labeling) ist eine Technik zum Nachweis von Apoptose in Gewebeschnitten. Dabei ermöglicht eine terminale Desoxynukleotidyltransferase die Markierung freier DNA-Strangbrüche mittels Fluorescein-markierter dUTP-Moleküle, die in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können. Obwohl eine unspezifische Mitfärbung von vereinzelt Nekrosen bei massivem DNA-Abbau nicht ausgeschlossen werden kann, stellt die TUNEL-Färbung ein hochspezifisches und sensitives Verfahren zum Apoptosenachweis dar. Die Präparate werden für 1h mit der TUNEL-Reagenz inkubiert und nach Kernfärbung mit DAPI eingedeckelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Exzitation  $\lambda = 488 \text{ nm}$ , Emission  $\lambda = 519 \text{ nm}$ ) analysiert und fotografiert.

### 3.3.7.6 Auswertung der Immunhistochemie

Zur Analyse werden alle Schnitte unter dem Mikroskop in 10facher Vergrößerung fotografiert und gespeichert. Zur Kontrolle der Einstellungen wird jeweils ein Objektträger mit Maßstab mitfotografiert. Alle positiven Zellen werden gezählt und entweder mit der Fläche der Intimahyperplasie oder mit der Mediafläche korreliert.

### 3.3.8 Real-time RT-PCR



**Abbildung 15: Schematischer Ablauf der cDNA Synthese**

#### 3.3.8.1 mRNA Isolierung

Zunächst werden die Arteriensegmente in 1000µl Lysis-Binding-Buffer (100mM TRIS/HCl pH 7,5, 500mM LiCl, 10mM EDTA pH 8,0, 1%IIDS, 5mMDTT) zerkleinert und durch wiederholtes vortexen lysiert. Anschließend gibt man 50µl magnetische Poly-A Beads (Dynabeads) dazu, um die mRNA zu extrahieren. Die mRNA bindet über ihren Polyadenylatschwanz an den oligo-dT Schwanz der Beads. Nach 30 Minuten Inkubationszeit der Suspension bei 4°C unter Rotation wird das Reaktionsgefäß in den Magneten (MPC Magnetic Particel Concentrater, Dynal, Norwegen) überführt. Die magnetische Wirkung zieht die mRNA gebundenen Beads an und ermöglicht ein einfaches Entfernen des Überstandes. Nach dem Resuspendieren der Beads in 80µl Waschpuffer Igepal (50mM TRIS/HCl pH 8,0, 75mM KCl, 10mM DTT, 0,25% Igepal) erfolgt die Überführung der Lösung in PCR Tubes (0,2ml Kikser, Deutschland).

### 3.3.8.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese findet mittels reverser Transkription statt. Dafür wird die isolierte mRNA bei 44°C für 45 Minuten im Hybridisierungssofen mit einer RNase-H defizienten reversen Transkriptase (Superscript II) in Gegenwart von den Nucleotiden dATP, dGTP, dCTP, dTTP und des CFL5C-Primers (5'-(CCC)<sub>5</sub>GTCTAGA(NNN)<sub>2</sub>-3') in cDNA umgeschrieben.

Durch Tailing wird die cDNA mit dNTPs am 3'Ende markiert. Dafür wird das Enzym terminale Desoxynucleotidtransferase benutzt.

### 3.3.8.3 Amplifizierung der cDNA

Die erhaltene cDNA wird anschließend global amplifiziert, um eine ausreichende Menge an cDNA zu erhalten. Die Amplifizierung findet mit Hilfe des CP2-Primers (5'TCA GAA TTC (CCC)<sub>5</sub>-3') statt, der an dem im Tailingschritt eingebauten dGTP-Schwanz der cDNA bindet. Die PCR-Reaktion läuft im Thermocycler (MultiCycler PTC 200, MJ Research Biozym, Deutschland).

### 3.3.8.4 Kontroll-PCR (Polymerase Kettenreaktion)

Um die erfolgreiche mRNA-Präparation und cDNA-Synthese mit anschließender globaler cDNA-Amplifizierung zu überprüfen, wurde bei allen gewonnen cDNAs eine Kontroll-PCR mit Primern für die Housekeeping-Gene  $\beta$ -Actin und EF-1 $\alpha$  (Elongationsfaktor-1 $\alpha$ ) durchgeführt.

<b><u><math>\beta</math>-Actin:</u></b>	5'GCTCGGTCAGGATCTTCATGAGG3' 5'ACCTTCAACACCCCAGCCATG3'
<b><u>EF-1<math>\alpha</math>:</u></b>	5'TTTCAGTTTGTCTAAGACCCAGGC3' 5'CTCACATCAACATCGTCGTAATCG3'

**Tabelle 10: Housekeeping-Gene**

Die PCR läuft im Thermocycler (MultiCycler PTC 200, MJ Research, Biozym, Deutschland) ab; anschließend werden die PCR Produkte in einem 2%igen

Agarosegel (2g Agarose auf 100 ml 1 x TAE (4,84g TRIS, 1,142ml Eisessig, 2ml 0,5 M EDTA pH 8,0, ad 1000mlH<sub>2</sub>O)), welches 8µl Ethidiumbromid (10mg/ml) enthält, elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Zum Größenvergleich läuft ein Marker (Gene Ruler™ DNA, Ladder Mix) auf dem Gel mit.

### 3.3.8.5 Real-time quantitative PCR (TaqMan Sonde)

Bei der real-time RT-PCR handelt es sich um eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR funktioniert und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden, wobei die Fluoreszenz dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt. Um das zu erreichen werden die cDNA-Proben dem Template Volumen (1µl) angepasst. Für die Reaktion selbst wird auf der einen Seite der PCR Master Mix (Applied Biosystems) eingesetzt, der sowohl die Taq-Polymerase als auch den Fluoreszenzfarbstoff (FAM) enthält, auf der anderen Seite finden die gewünschten Primer mit der cDNA Verwendung.

10µl 2x PCR-Master Mix 2µl 10x Primer 1µl DNA (1:10 verdünnt) 8µl H <sub>2</sub> O
---

**Tabelle 11: Ansatz Taq-Polymerase**

Folgende Primer wurden verwendet:

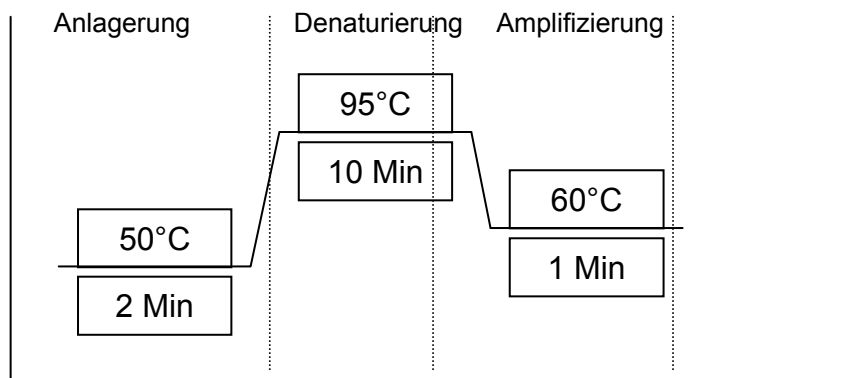
<b><u>CXCR3:</u></b>	#Mm00438259_m1; (Applied Biosystems, USA)
<b><u>IP10:</u></b>	#Mm99999072_m1; (Applied Biosystems, USA)
<b><u>MIG:</u></b>	#Mm01345157_m1; (Applied Biosystems, USA)
<b><u>GAPDH:</u></b>	#Mm99999915_g1; (Applied Biosystems, USA)

**Tabelle 12: Primer real-time RT-PCR**

Die 96-well Reaktionsgefäße (Quali-PCR Platten, Kisker, Deutschland) werden in das real time PCR Gerät Abi Prism 7700 (Sequence Detector, Applied Biosystems, USA) überführt und folgendes Programm gestartet:

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>
1. Anlagerung	50°C	2 Minuten
2. Denaturierung	95°C	10 Minuten
3. Denaturierung	95°C	15 Sekunden
4. Amplifizierung	60°C	60 Sekunden
5. 40 Zyklen Schritt 3 und 4		
6. Lagerung bei 4°C		

**Tabelle 13: Temperaturschritte real-time RT-PCR**



**Abbildung 16: Schematische Darstellung der Thermalen Cycler Bedingungen**

### 3.3.8.6 Auswertung der real-time PCR (TaqMan Sonde)

Die Emissionswellenlänge für die mit dem Farbstoff FAM markierte TaqMan-Sonde ist 492nm und die Detektionswellenlänge liegt bei 515nm. Die Ergebnisse werden jeweils zum Housekeeping-Gen GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) in Relation gesetzt. Als Maß für die Veränderung der Genexpression wird der "Cycle threshold" (Ct)-Wert bestimmt. Der Ct-Wert ist umgekehrt proportional zu der Kopienzahl eines Transkriptes, d.h. je höher die Konzentration eines Transkriptes ist, desto niedriger ist der Ct-Wert ( $\Delta\text{Ct}$ ) (PFAFFL 2001).

### **3.3.9 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

#### **3.3.9.1 IP10 und MIG ELISA**

Von der Firma R&D Systems, USA, wurden als ELISA-Kits mouse CXCL10/IP10 (#MCX100; Part 892349) und mouse CXCL9/MIG (#MCX900, 892230) bezogen.

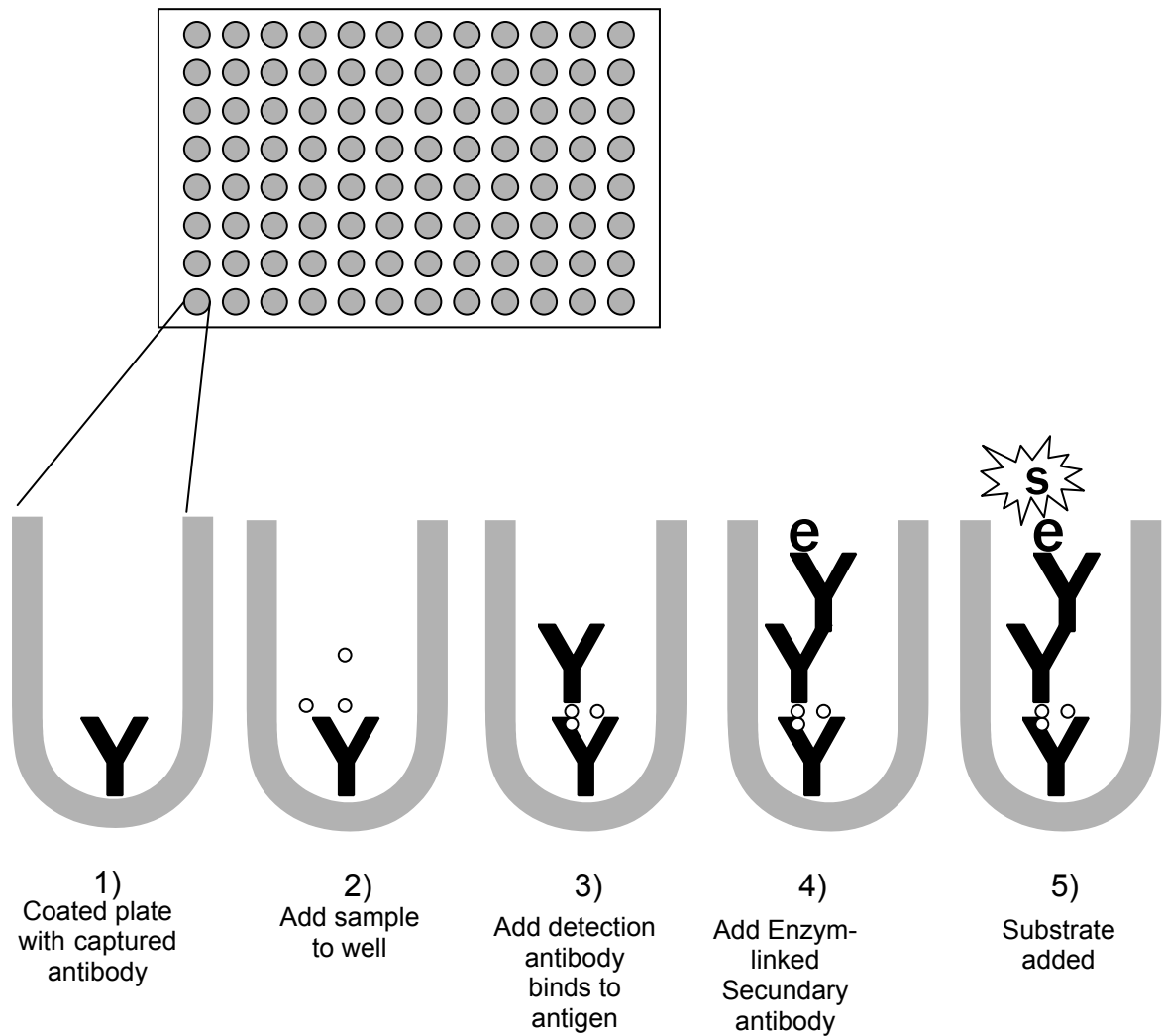
#### **3.3.9.2 Konzentrationsbestimmung von IP10 und MIG im murinen Serum**

Bei dem Sandwich-ELISA sind die Reaktionsvertiefungen der Mikrotiterplatte mit einem primären Antikörper beschichtet. Nach Zugabe des Serums binden sich darin enthaltene Antigene mit diesen Antikörpern. Ungebundene Antigenproteine werden ausgewaschen und die Platte wird mit einem zweiten, enzymmarkierten Antikörper beschichtet. Nach Bindung der markierten Antikörper werden die Überschüsse erneut ausgewaschen. Anschließend zugegebenes Substrat wird durch das Enzym umgesetzt, was an einem Farbumschlag zu erkennen ist. Dieser Umsatz wird mit einer Stoplösung unterbrochen und der Test anschließend photometrisch ausgewertet. Die optische Dichte (messbare Extinktion) des entstehenden Farbumschlages verhält sich proportional zur Antigenkonzentration in der eingesetzten Probe. Aus der parallel zu den Serumproben eingesetzten Standardlösung mit bekannter Antigenkonzentration wird eine Standard-Kalibrations-Kurve berechnet. Damit ist eine quantitative Aussage über die Konzentration möglich.

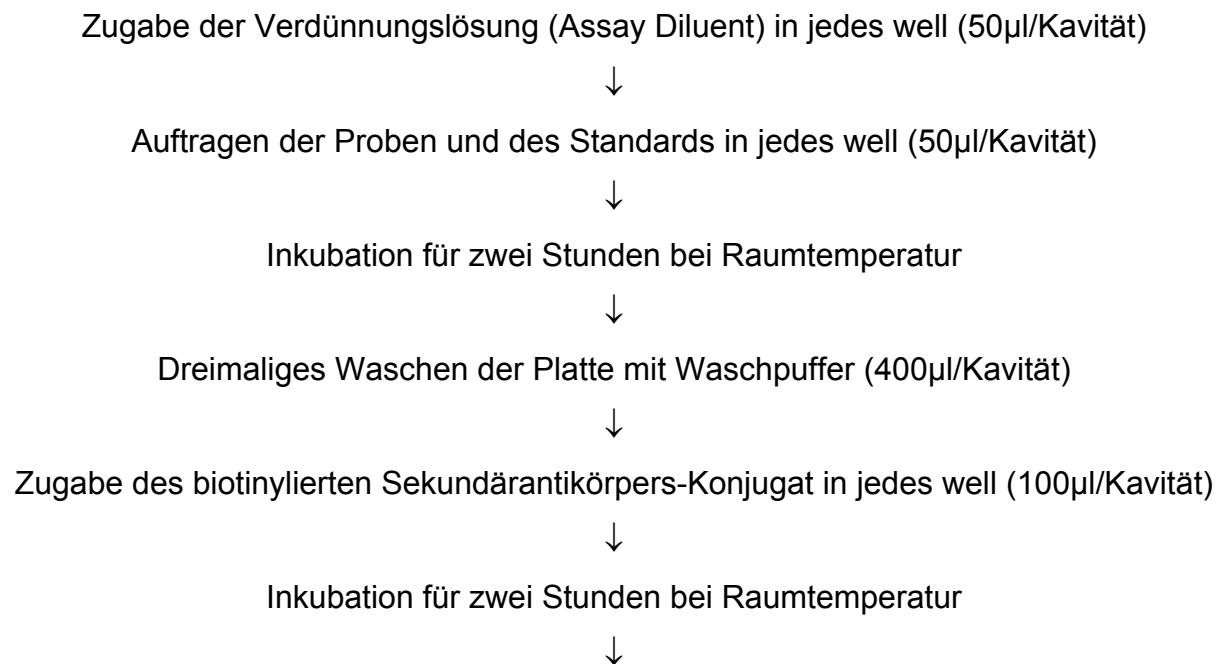
In der vorliegenden Studie wurde die Serumkonzentration der beiden CXCR3 Liganden IP10 und MIG vor Gefäßverletzung 0d, 7 d und 14d nach Gefäßverletzung untersucht.

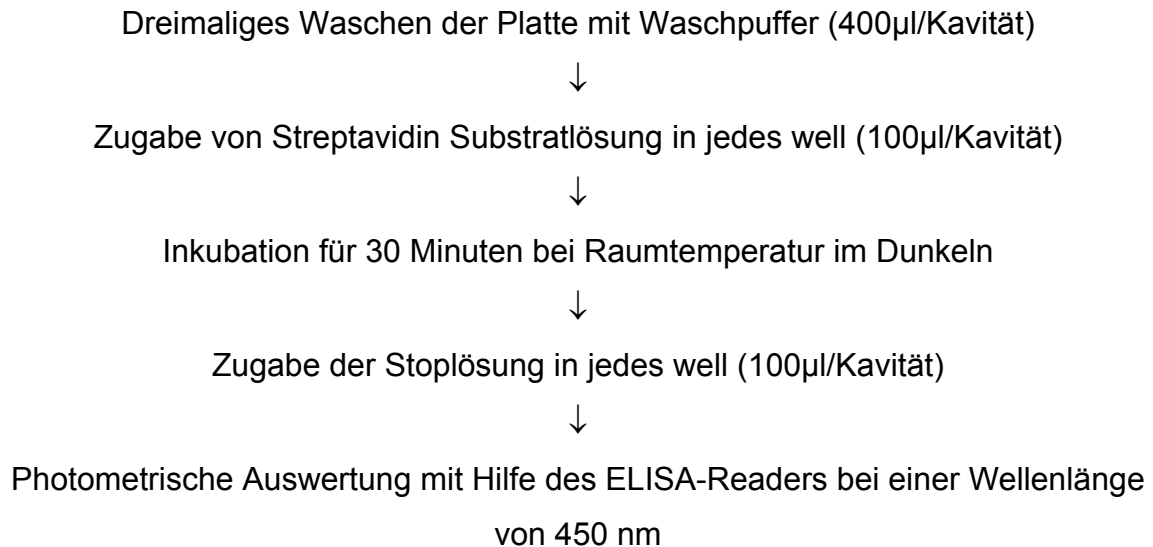
Die Durchführung des ELISAs ist bei beiden Chemokinen gleich und kann , wie nachfolgend schematisch dargestellt werden:





**Abbildung 17: Schematische Darstellung ELISA**





Anhand der ermittelten optischen Dichte und der bekannten Konzentrationen aus der Standardreihe berechnet der ELISA-Reader (Biotrak II plate reader, Amersham Biosciences, USA) automatisch die Konzentrationen der jeweiligen Proben.

### **3.3.10 Zellkultur**

Alle Arbeiten in der Zellkultur finden an einer sterilen Reinraumwerkbank (Hera Safe, Heraeus Instruments GmbH, Deutschland) statt. Die Zellen werden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97% in einem Begasungsbrutschrank (HeraCell, Heraeus Instruments GmbH, Deutschland) kultiviert. Um steriles Arbeiten zu ermöglichen werden alle Geräte und Materialien vor ihrem Einsatz desinfiziert oder sterilisiert. Die Reinraumwerkbank wird jeden Tag mittels einer UV-Lampe bestrahlt.

#### **3.3.10.1 Standardkultivierung von Zellen**

Glatte humane koronare Muskelzellen (HCSMC, Human coronary smooth muscle cells; Clonetics, USA) und aus der Nabelschnur stammende humane Endothelzellen (HUVEC, Human umbilical vein endothelial cells; Clonetics, USA) werden in folgenden Kulturflaschen und Medien gehalten:

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

<u>HCSMC:</u>	Tissue Culture Flask, coated with 0,2% Gelatine (PE vented yellow cap, Sarstedt, Deutschland) SMmBM Basal Medium (Clonetics, USA) SMGM-2 Zusatz (Clonetics, USA)
<u>HUVEC:</u>	Tissue Culture Flask, coated with 0,2% Gelatine (PE vented yellow cap, Sarstedt, Deutschland) EBM-2 Medium (Clonetics, USA) EGM-2 SingleQuots (Clonetics, USA)

**Tabelle 14: Kulturflaschen und Medium für HCSMCs und HUVECs**

Bei einem Konfluenzgrad von 80% werden die Zellen auf 2-3 weitere Zellkulturflaschen gesplittet. Beide Zelllinien werden zwischen der vierten und siebten Passage für die Versuche genutzt. Da es sich bei beiden um adhärenente Zellen handelt müssen sie mit Hilfe von 5-10ml Cell Dissociation Solution (Sigma, USA) aus den Zellkulturflaschen gelöst werden. Durch Zentrifugation (Megafuge 1.OR, Heraeus Instrument; 1600 Umdrehungen, 10 Minuten) werden sie auf die gewünschte Konzentration gebracht. Die Zellzählung findet mittles der Neubauerzählkammer statt. Dabei werden alle Zellen in einem großen Quadranten der Zählkammer ausgezählt, wobei die Zellen, die die linke und die obere Linie berühren, mitgezählt werden.

Als weitere Zellen werden MonoMac6 genutzt. Dabei handelt es sich um eine Zelllinie, die humanen Monozyten sowohl in Oberflächenrezeptoren aber auch in ihrem Verhalten ähnelt (ZIEGLER-HEITBROCK et al. 1988). Diese Zellen sind nicht adhärenent und werden in folgenden Kulturflaschen und Medien gehalten:

<u>MonoMac6:</u>	Tissue Culture Flask (PE vented green cap, Sarstedt, Deutschland) VLE RPMI 1640 Medium, (Biochrom, F1415) FKS Dexter 500, (Cell systems, 06450)
------------------	--

**Tabelle 15: Kulturflaschen und Medium für MonoMac 6**

Für die Versuchsansetzung werden von allen Zellenlinien jeweils 10000 Zellen pro well auf eine 96-well-Platte ausgesät und für 24h in dem jeweiligen serumfreien Medium gehalten. Die Zellen, die Sirolimus (100nM, Sigma, USA) und Everolimus (100nM, Sigma, USA) erhalten, werden ebenfalls für 24h prä-inkubiert. Die

Stimulation von Apoptose und ROS-Bildung erfolgt dann mit humanen IP10 (0,01 µg/ml, Sigma, USA) für 2 Stunden.

### **3.3.10.2 Apoptosestimulation mit IP10**

Für die Analyse der Apoptose wird wie bei der immunhistologische Analyse die TUNEL-Technik (In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, TUNEL technology, Roche) genutzt. Dabei werden durch die Terminale-Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) die bei der Apoptose entstehenden freien 3'OH DNA- Enden detektiert. Da die TdT mit einem Fluoreszenzfarbstoff gelabelt ist kann die Apoptose mit Hilfe eines Extinktionsreaders (Safire Multi-Detection Monochromometer Microplate Reader, Tecan, Schweiz) gemessen werden. Dabei liegt die Extinktion bei 490 nm und die Emission bei 540 nm.

### **3.3.10.3 Stimulierung der ROS-Bildung durch IP10**

Zur Messung der Sauerstoffradikale wird der gleiche Versuchsansatz gewählt. Statt der TUNEL-Reagenz wird den Zellen Dichlorofluorescein diacetate (50 µM, DCFH-DA, Invitrogen, USA) zugegeben. DCFH-DA ist hydrolysiert und wird, nachdem es von der Zelle aufgenommen wurde, durch endogene Esterasen zu Dichlorofluorescein (DCFH), wodurch es in der Zelle eingeschlossen ist und nicht mehr entweichen kann. Dieses nicht-fluoreszierende Molekül wird anschließend durch zelluläre Oxidantien (Sauerstoffradikale) zu dem fluoreszierenden DCF oxidiert (ROBINSON et al. 1988). Die Stärke der Fluoreszenz korreliert dabei positiv mit dem Ausmaß der intrazellulären ROS-Bildung. Auch diese Fluoreszenz wird daraufhin im Extinktionsreaders (Safire Multi-Detection Monochromometer Microplate Reader, Tecan, Schweiz) bei 480nm Extinktion und 540nm Emission gemessen.

Sowohl bei der Apoptose-Messung als auch bei der ROS-Messung werden die Zellen im Anschluss an den Versuch mit Alamar Blue (Invitrogen, USA) für 12h inkubiert. Durch Absorptionsmessungen bei 580nm kann dann die Zellviabilität und Zellaktivität analysiert werden und anschließend mit den davor gemessenen Werten korreliert werden.

### 3.3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung (deskriptive Statistik, Korrelationsanalyse, Konvergenzintervallanalyse) der quantitativ erfassbaren Untersuchungsergebnisse erfolgt mit dem Statistikprogramm SPSS 11.0 (SPSS11.0 für Windows, SPSS Inc., USA) und mit dem Programm Microsoft®Excel 1997. Für die Auswertung der real-time RT-PCR wird die  $\Delta$ ct-Methode genutzt und mittels der Berechnung des Konvergenzintervalls statistisch ausgewertet (PFAFFL 2001). Zur Ermittlung der statistischen Unterschiede in den morphometrischen und immunhistochemischen Daten wird die Varianzanalyse ANOVA und der t-Test genutzt. Die Ergebnisse der ELISAs wird mit dem t-Test statistisch ausgewertet. Korrelationen werden durch den Pearson's r-Test ermittelt. Alle Mittelwerte (MW, arithmetisches Mittel) der einzelnen Untergruppen werden aus den Einzelwerten berechnet und  $\pm$  SEM (Standard error of the mean) dargestellt. Als statistisch signifikant wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 5\%$  ( $p < 0,05$ ) vorausgesetzt.

### 3.4 Ergebnisse

#### 3.4.1 Der Einfluss von IP10 und MIG auf die Rekrutierung CXCR3<sup>+</sup> Zellen

Eine erste Frage ist, ob CXCR3 und seine beiden Liganden IP10 und MIG eine Rolle in der Reaktion der Gefäßwand auf eine Verletzung *in vivo* spielen.

##### 3.4.1.1 Hochregulation von IP10, MIG und CXCR3

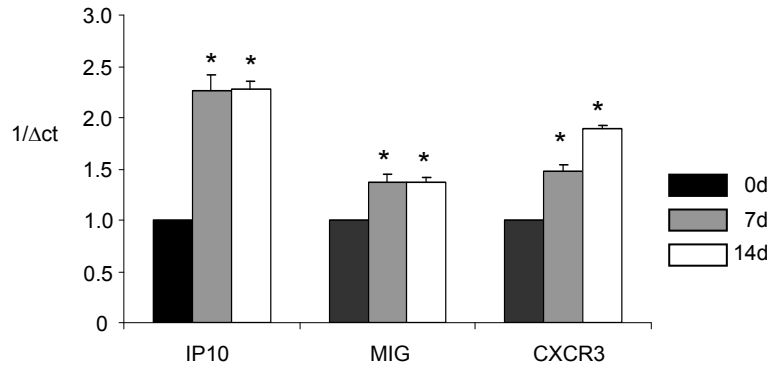
Um zu einer Antwort zu gelangen, werden 129S1/SvIMJ-Mäuse dem Gefäßverletzungsmodell unterzogen. Durch das Einführen des Drahtes in die A. Femoralis der Maus kommt es zur Dilatation des Gefäßes und zur Denudation des endothelialen Monolayers (SATA et al. 2000). Im Vergleich zur unverletzten Kontrolle zeigen die Gefäßproben, die der Gefäßverletzung unterliegen, eine deutliche Hochregulierung der beiden CXCR3 Chemokine IP10 und MIG in der mRNA Expression ( $p < 0,05$  vs. Baseline, Abb. 18).

Einen ähnlichen Verlauf zeigt die Serumproteinkonzentration von IP10 und MIG. Aus der ELISA-Auswertung ist ersichtlich, dass beide Proteine 7d und 14d nach der Gefäßverletzung deutlich hochreguliert sind ( $p < 0,05$  vs. Baseline, Abb. 19).

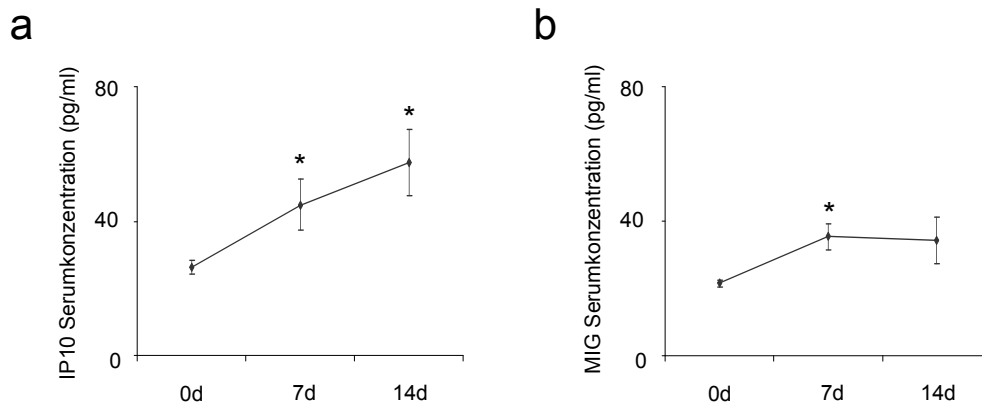
Diese Freisetzung der beiden CXCR3 Liganden IP10 und MIG ist mit einer Induktion der CXCR3 mRNA Expression in der quantitativen real-time PCR verbunden ( $p < 0,05$  vs. Baseline, Abb. 18).

Ebenso kann eine verstärkte Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup>-Zellen bei den verletzten Gefäßen in der immunhistochemischen Analyse festgestellt werden. So kann nach 7d ein deutlicher Anstieg von CXCR3<sup>+</sup>-Zellen in der Intimahyperplasie beobachtet werden, der sich nach 14d sogar noch verstärkt ( $p < 0,05$  vs. unverletzte Kontrolle, Abb. 20).

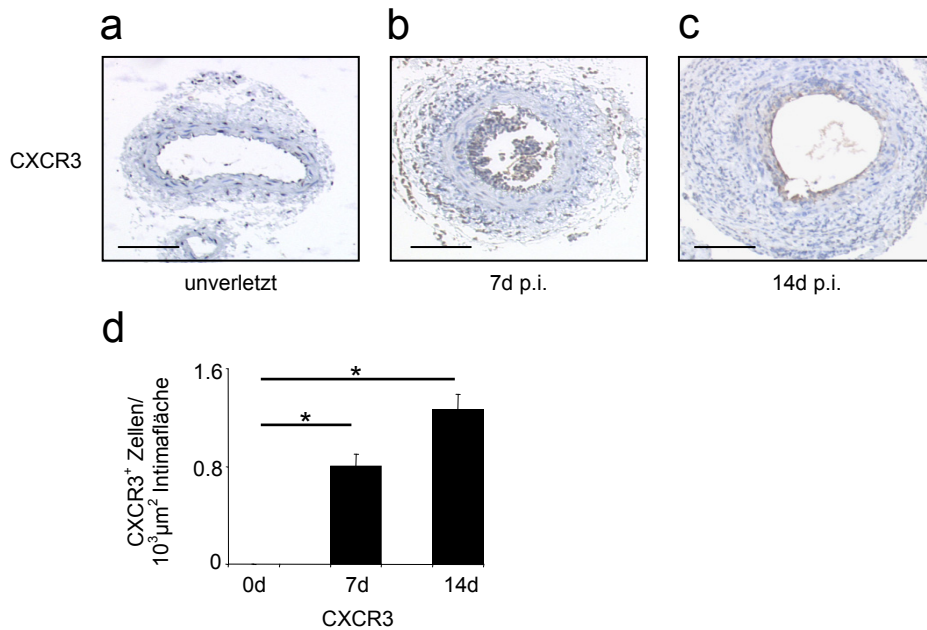
Diese Ergebnisse zeigen, dass die Gefäßverletzung *in vivo* zu einer deutlichen Induktion von IP10 und MIG führt und es dadurch zur Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup>-Zellen zur Stelle der Endotheldenudation kommt. Diese Resultate deuten auf eine entscheidende Rolle der CXCR3-Achse (bestehend aus CXCR3 und den beiden Liganden IP10 und MIG) bei der Aktivierung von vaskulären Reparaturprozessen hin.



**Abbildung 18:** Die Gefäßverletzung wurde in WT Mäusen induziert und nach Aufbereitung der Gefäße die mRNA-Expression von IP10, MIG und CXCR3 mit einer quantitativen real-time PCR an den Zeitpunkten 0, 7 und 14d gemessen. Alle Expressionswerte wurden zu den jeweiligen Werten des Housekeeping-Gens GAPDH normalisiert und als  $\Delta ct$  dargestellt. Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben, für jeden Zeitpunkt ist  $n=7$  (\*= $p<0,05$ ).



**Abbildung 19:** Verlauf der IP10 (a) und MIG (b) Serumproteinkonzentration nach Gefäßverletzung. (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n=8$  je Zeitpunkt, \*= $p<0,05$  vs. Baseline).



**Abbildung 20:** Die Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup> Zellen in den verletzten Gefäßen ist durch immunhistochemische Analyse dargestellt. (a), (b) und (c) stellen repräsentative, auf CXCR3 gefärbte Bilder der verletzten Gefäße an den drei Zeitpunkten (a) un verletzt, (b) 7d nach Verletzung und (c) 14d nach Verletzung dar (Maßstabsbalken = 100μm). (d) zeigt die statistische Quantifizierung der immunhistochemischen CXCR3-Färbung (Mittelwert ± SEM, n=8 je Zeitpunkt, \*=p<0,05 vs. unverletzten Gefäßen an 0d).

### 3.4.2 Exprimierung von CXCR3 auf hämatopoetischen Zellen

Neben T-Zellen und Endothelzellen wird auch hämatopoetischen Vorläuferzellen eine zentrale Rolle in vaskulären Reparatur- und Remodelingprozessen zugeschrieben (SATA et al. 2002; DIMMELER u. ZEIHNER 2004; NÜHRENBURG et al. 2005; ZERNECKE et al. 2005; MASSBERG et al. 2006). Die Expression von CXCR3 ist nicht nur auf T Zellen beschränkt; vielmehr kann dieser Chemokinrezeptor auch auf verschiedenen anderen hämatopoetischen Zelllinien wie beispielweise hämatopoetischen Vorläuferzellen und Endothelzellen nachgewiesen werden (LOETSCHER et al. 1996; JINQUAN et al. 2001; ROMAGNANI et al. 2001; HILLYER et al. 2003).



### 3.4.2.1 Zelluläre Zusammensetzung der Intimahyperplasie

In einer Immunfluoreszenzfärbung werden die verletzten WT-Arterien an den Tagen 0, 7 und 14 mit den Markern CD3 für T-Zellen, c-kit für hämatopoetische Vorläuferzellen, CD31 für Endothelzellen und  $\alpha$ -actin für glatte Muskelzellen markiert. Das entspricht den Hauptkomponenten der zellulären Zusammensetzung des intimalen Gewebes nach Gefäßverletzung (KOMATSU et al. 1998; FARB et al. 2002).

In den denudierten Gefäßsegmenten kann eine Akkumulation von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen und c-kit<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen beobachtet werden (Abb. 21). Wie zu erwarten nimmt die Nummer der CD31<sup>+</sup>-Zellen signifikant nach der Endotheldenudation ab (Abb. 21).

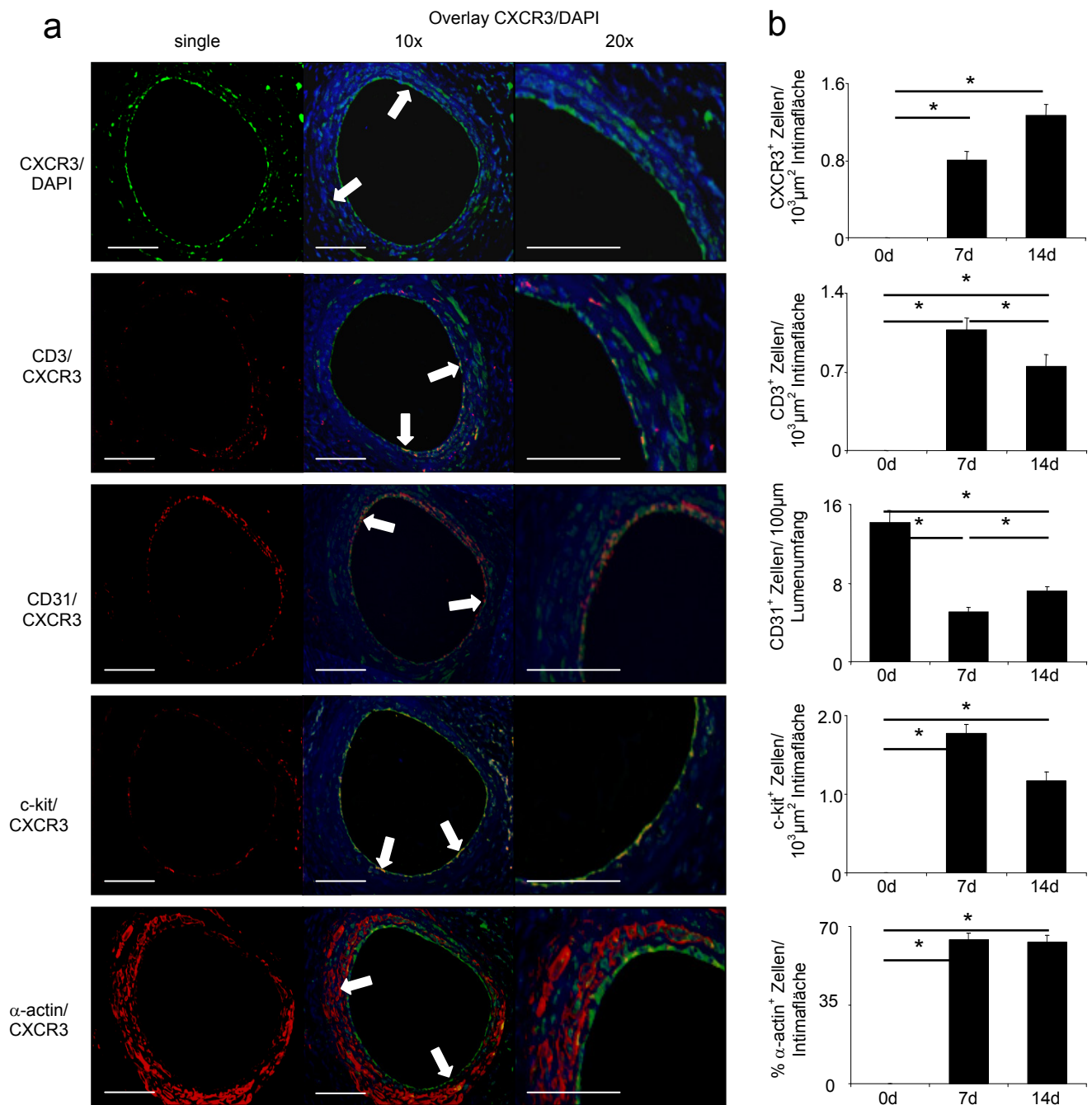
### 3.4.2.2 Expressierung von CXCR3 auf T-Zelle, Endothelzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen

Zur weiteren Charakterisierung der CXCR3<sup>+</sup>-Zellen in den verletzten Arteriensegmenten wird eine Doppelimmunfluoreszenz für CXCR3 mit den oben genannten Zelltypmarkern CD3, CD31, c-kit und  $\alpha$ -actin 14 d nach Gefäßverletzung durchgeführt (Abb. 21).

Wie man in den Abbildungen 22 sehen kann, korrespondiert ein großer Teil der CXCR3<sup>+</sup> Zellen mit CD3<sup>+</sup>-T-Zellen (34,0%) und mit c-kit<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen (27,6%). Zu einem etwas geringeren Anteil exprimieren CD31<sup>+</sup> Endothelzellen (25,7%) CXCR3. Im Gegensatz dazu wird CXCR3 fast nicht auf  $\alpha$ -actin<sup>+</sup>-glatten Muskelzellen exprimiert (3,3%).

In Abbildung 23 ist zu sehen, dass der überwiegende Teil der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen (80,3%) und fast alle der c-kit<sup>+</sup>-hämatopoetischen Vorläuferzellen (92,6%) gleichzeitig auch CXCR3 an ihrer Oberfläche exprimieren, wohingegen CD31<sup>+</sup>-Endothelzellen CXCR3 nur zu 54,9% koexprimieren. Erwartungsgemäß gibt es fast keine Koexpression zwischen CXCR3 und  $\alpha$ -actin<sup>+</sup>-glatten Muskelzellen (3,5%).

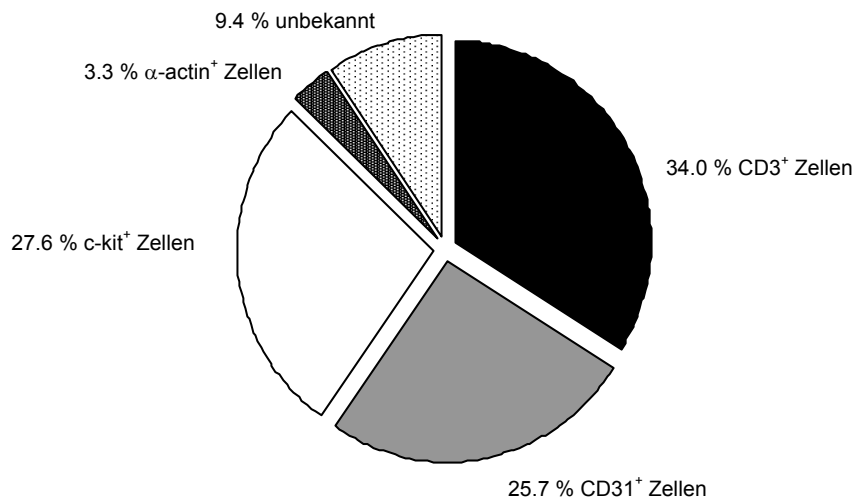
Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass CXCR3 nicht nur auf T-Zellen exprimiert wird, sondern auch mit Endothelzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen korrespondiert. Das bedeutet, dass die Funktion der CXCR3-Achse nicht nur auf die zelluläre Immunität während des Gefäßremodeling beschränkt ist.



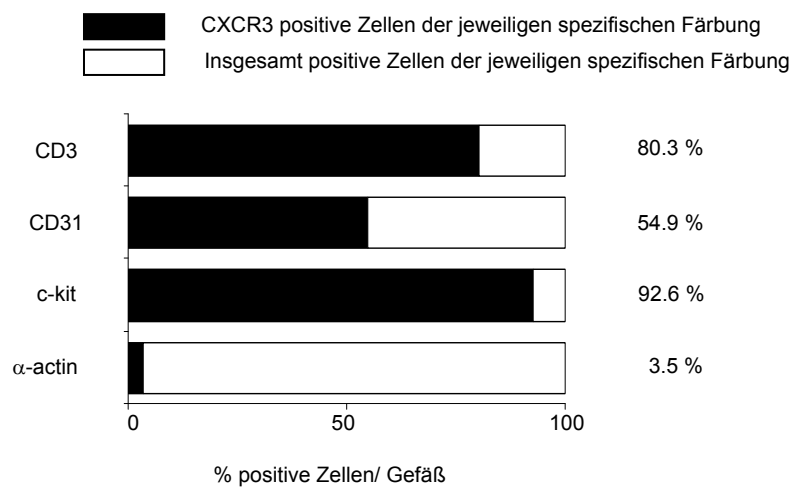
**Abbildung 21:** (a) Doppelimmunfluoreszenz von murinen verletzten Femoralisarterien, um die verschiedenen Zelltypen, die CXCR3 exprimieren, zu charakterisieren. CXCR3<sup>+</sup>-Zellen (grün) werden jeweils mit den entsprechenden anderen Zellmarkern (rot) dargestellt. Dabei steht CD3 für T-Zellen, CD31 für Endothelzellen, c-kit für hämatopoetische Vorläuferzellen und  $\alpha$ -actin für glatte Muskelzellen. Als Kernfärbung dient DAPI (blau) (Maßstabsbalken = 100 $\mu$ m). (b) Quantifizierung der Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup>-Zellen, CD3<sup>+</sup>-T-Zellen, CD31<sup>+</sup>-Endothelzellen, c-kit<sup>+</sup>-hämatopoetischen Vorläuferzellen und  $\alpha$ -actin<sup>+</sup> glatten Muskelzellen nach den Zeitpunkten 0, 7 und 14d.

(Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n > 7$  je Zeitpunkt je Färbung,  $*=p<0,05$  vs. unverletzte Gefäßen).

## CXCR3<sup>+</sup>-Zellen sind...



**Abbildung 22:** Die statistische Quantifizierung zeigt, dass CXCR3<sup>+</sup>-Zellen fast zu gleichen Teilen CD3<sup>+</sup>-T-Zellen, c-kit<sup>+</sup>-hämatopoetische Vorläuferzellen und CD31<sup>+</sup>-Endothelzellen sind (Mittelwert der koexprimierten Zellen,  $n > 7$ )



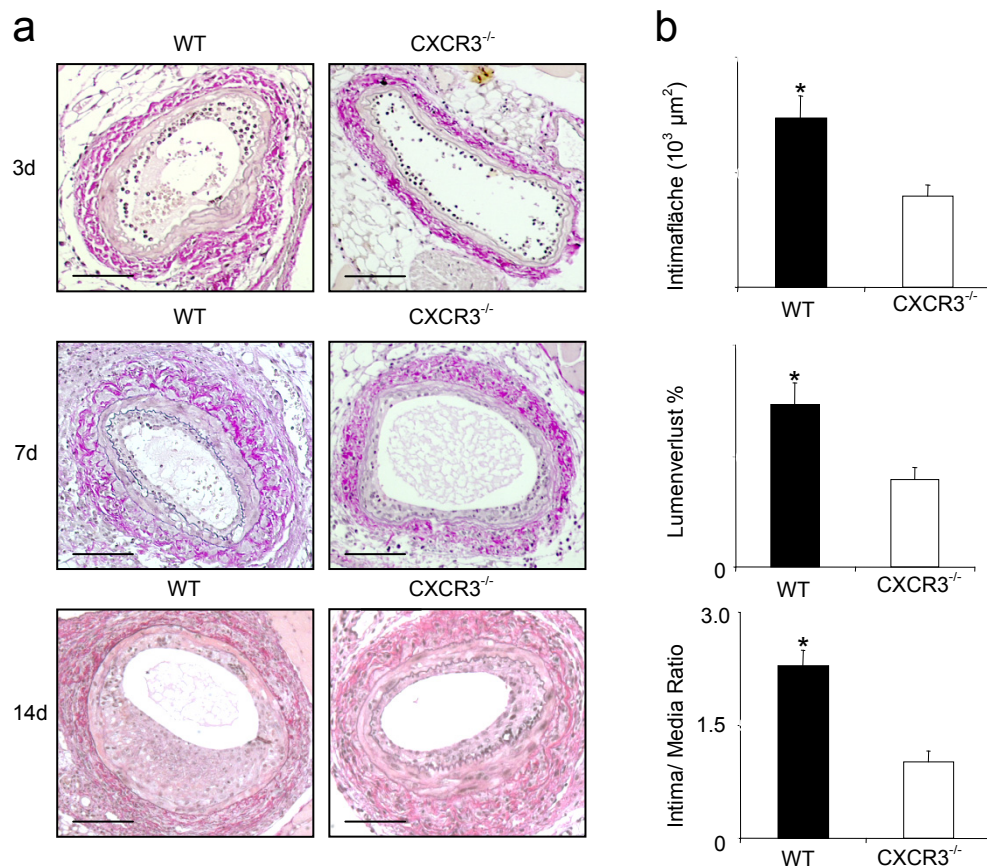
**Abbildung 23:** Statistische Analyse des prozentualen Anteiles der CXCR3<sup>+</sup>-Zellen an den jeweiligen anderen Zelltypen.

### **3.4.3 Verminderung der Intimahyperplasie durch Blockade der CXCR3-IP10-MIG-Achse**

Die IFN- $\gamma$  vermittelte Immunantwort spielt bei den Folgen einer Gefäßverletzung eine zentrale Rolle und ist bereits ausführlich beschrieben (TELLIDES et al. 2000; ZOHLNHÖFER et al. 2001b; RANJBARAN et al. 2007; TELLIDES u. POBER 2007). Die Auswirkung der beiden Chemokine IP10 und MIG auf die Gefäßverletzung bzw. auf das vaskuläre Remodeling ist bis jetzt noch nicht näher untersucht worden.

#### **3.4.3.1 Reduktion der Intimahyperplasie durch genetische CXCR3-Defizienz**

Die Hochregulierung der CXCR3-Chemokine IP10 und MIG und die anschließende Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup>-Zellen an die Stelle der Gefäßverletzung liefert einen Anlass, uns die kausale Rolle der CXCR3-Achse in der Gefäßverletzung anhand von CXCR3-Knockout-Mäusen näher zu untersuchen. Dafür werden CXCR3<sup>-/-</sup> und CXCR3-WT-Mäuse dem Gefäßverletzungsmodell unterzogen und nach 14d histomorphometrisch ausgewertet. Die CXCR3<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen 14d nach Endotheldenudation eine signifikant verringerte Intimahyperplasie (Abb. 24), einen signifikant verminderten Lumenverlust (Abb. 24) und eine signifikant minimierte Intima/Media Ratio (Abb. 24) im Vergleich zu den WT-Mäusen.

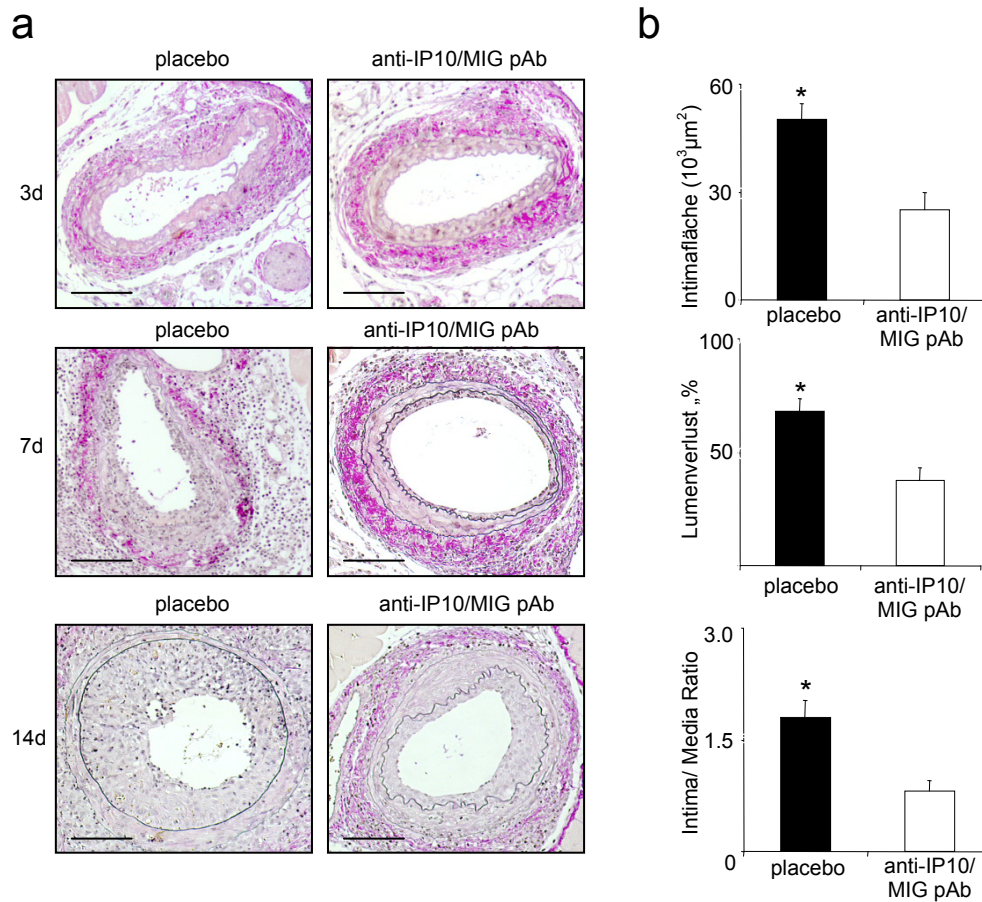


**Abbildung 24: Morphometrische Analyse wichtiger Gefäßparameter in CXCR3<sup>-/-</sup>-Mäusen gegenüber WT-Mäusen. (a) Repräsentative Bilder von verletzten Gefäßen von CXCR3<sup>-/-</sup> und CXCR3-WT-Mäusen im Zeitverlauf (3d, 7d, 14d; Elastica-van-Gieson; Maßstabsbalken = 100µm). (b) Quantitative Auswertung der intimalen Fläche, % Lumenverlust und Intima/Media Verhältnis nach 14d (Mittelwert ± SEM, n=8 je Gruppe, \*=p<0,05 vs. WT Mäusen).**

### 3.4.3.2 Reduktion der Intimahyperplasie durch Blockade von IP10 und MIG

Um diese Ergebnisse zu überprüfen und um ein neues Therapiekonzept zu testen, werden im zweiten Versuchsansatz 129S1/SvIMJ-Mäuse auch dem Femoralisverletzungsmodell unterzogen. Dabei wird eine Gruppe mit einem Placebo (Normales Kaninchenserum) und die andere Gruppe mit einem neutralisierenden polyklonalen Antikörpercocktail gegen die beiden CXCR3-Liganden IP10 und MIG (anti-IP10/MIG pAb) behandelt. Die Behandlung der 129S1/SvIMJ-Mäuse mit dem anti-IP10/MIG pAb Cocktail führt zum gleichen Phänotyp wie die CXCR3<sup>-/-</sup>-Mäuse: Es kommt zu einer signifikanten Reduktion der intimalen Fläche, einer Verringerung des

Lumenverlustes und einer Minimierung der Intima/Media Ratio nach 14d. Dies unterstützt die These, dass die CXCR3-Chemokine IP10 und MIG eine fundamentale Rolle in vaskulären Reparatur- und Remodelingprozessen nach Gefäßverletzung spielen.



**Abbildung 25: Morphometrische Analyse wichtiger Gefäßparameter in 129S1/SvIMJ Mäusen, von denen manche mit einem Placebo, andere hingegen mit einem neutralisierenden Antikörpercocktail gegen IP10 und MIG (anti-IP10/MIG pAb) behandelt wurden. (a) Repräsentative Bilder von verletzten Gefäßen von Placebo und anti-IP10/MIG-pAb-Mäusen im Zeitverlauf (3d, 7d, 14d; Elastica-van-Gieson; Maßstabsbalken = 100μm). (b) Quantitative Auswertung der intimalen Fläche, % Lumenverlust und Intima/Media Verhältnis nach 14d (Mittelwert ± SEM, n=10 je Gruppe, \*= $p < 0,05$  vs. Placebo behandelten Mäusen).**

### **3.4.4 Der Einfluss von CXCR3 auf die zelluläre Zusammensetzung der Intimahyperplasie**

Um den Einfluss der CXCR3-Defizienz auf die zelluläre Beschaffenheit der Intimahyperplasie nach Gefäßverletzung genauer zu untersuchen, werden immunhistochemische Zellmarker genutzt.

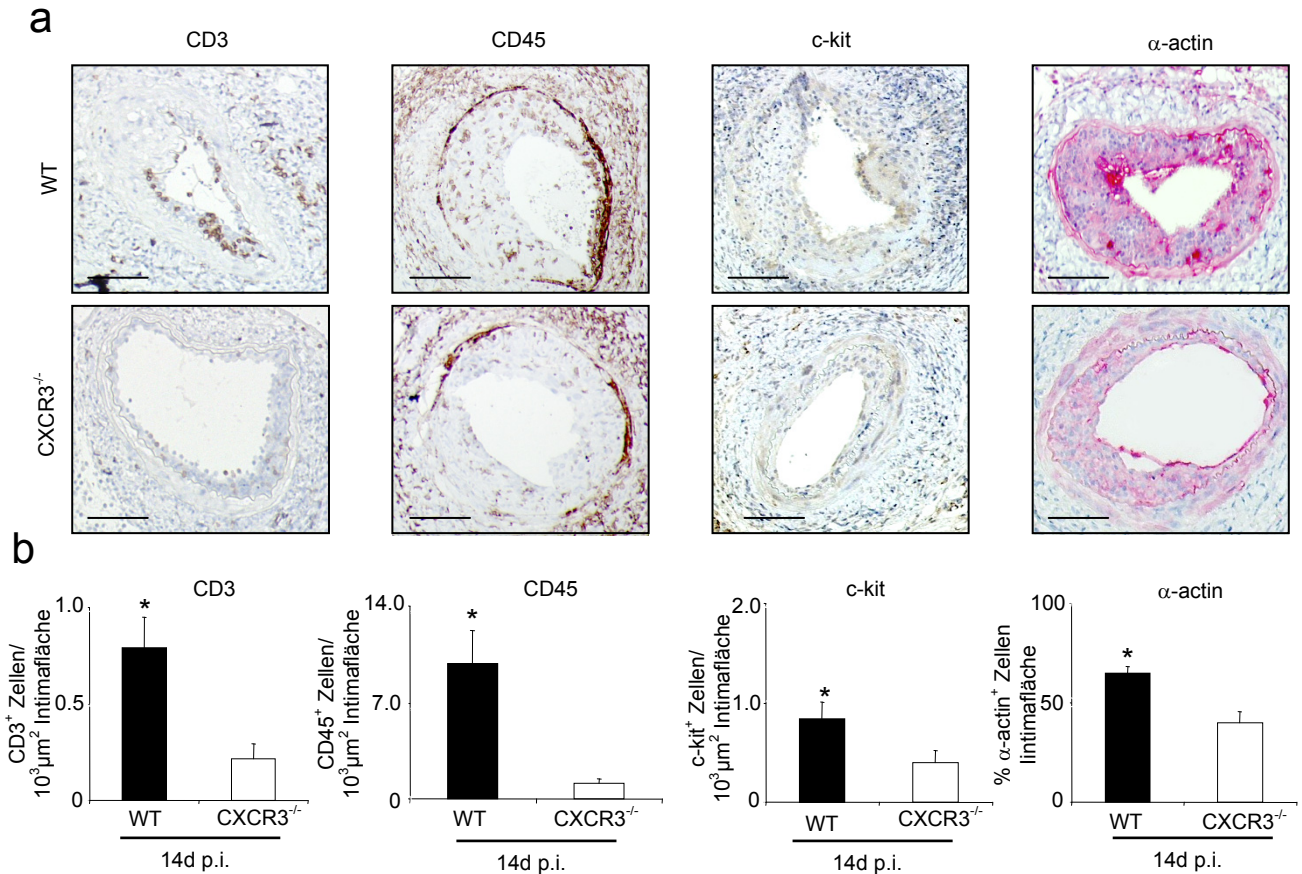
#### **3.4.4.1 Verminderung von Inflammation und geringere Rekrutierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen infolge einer CXCR3-Defizienz**

Erwartungsgemäß ist die Anzahl der T-Zellen (gezeigt durch den Marker CD3) in den CXCR3<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant reduziert im Vergleich zu den WT-Mäusen. Dieser Effekt ist von einer 8-fachen Abnahme von CD45<sup>+</sup>-Leukozyten begleitet, was darauf schließen lässt, dass die initiale T-Zellantwort die nachfolgende Chemotaxis von zirkulierenden Leukozyten beeinflusst (Abb. 26).

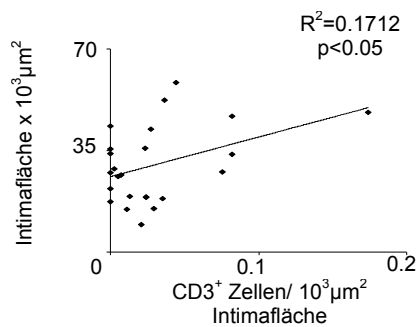
Dieser Zusammenhang wird zudem durch die Korrelation zwischen dem Ausmaß der Intimahyperplasie und der Rekrutierung von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen deutlich ( $R^2=0,1712$ , Abb. 27).

Wie die große Anzahl an CXCR3<sup>+</sup>-c-kit<sup>+</sup>-Zellen vermuten lässt, kann eine starke Abschwächung der Rekrutierung zirkulierender Vorläuferzellen in CXCR3<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen nach Endotheldenudation beobachtet werden. Des Weiteren war die Anzahl der  $\alpha$ -actin<sup>+</sup>-glatten Muskelzellen in der intimalen Fläche der CXCR3<sup>-/-</sup>-Mäuse ebenfalls nach Gefäßverletzung reduziert.





**Abbildung 26:** Immunhistochemische Analyse der zellulären Beschaffenheit der Intimahyperplasie in WT- und CXCR3<sup>-/-</sup>-Mäusen 14d nach der Femoralisverletzung. (a) Repräsentative Bilder der jeweiligen immunhistochemischen Färbungen (Maßstabsbalken=100μm). (b) Quantitative Auswertung der Immunhistochemie für T-Zellen (CD3), Leukozyten (CD45), hämatopoetische Vorläuferzellen (c-kit) und glatte Muskelzellen (α-actin), (Mittelwert ± SEM, n=8 je Gruppe, \*=p<0,05 vs. WT-Mäuse).



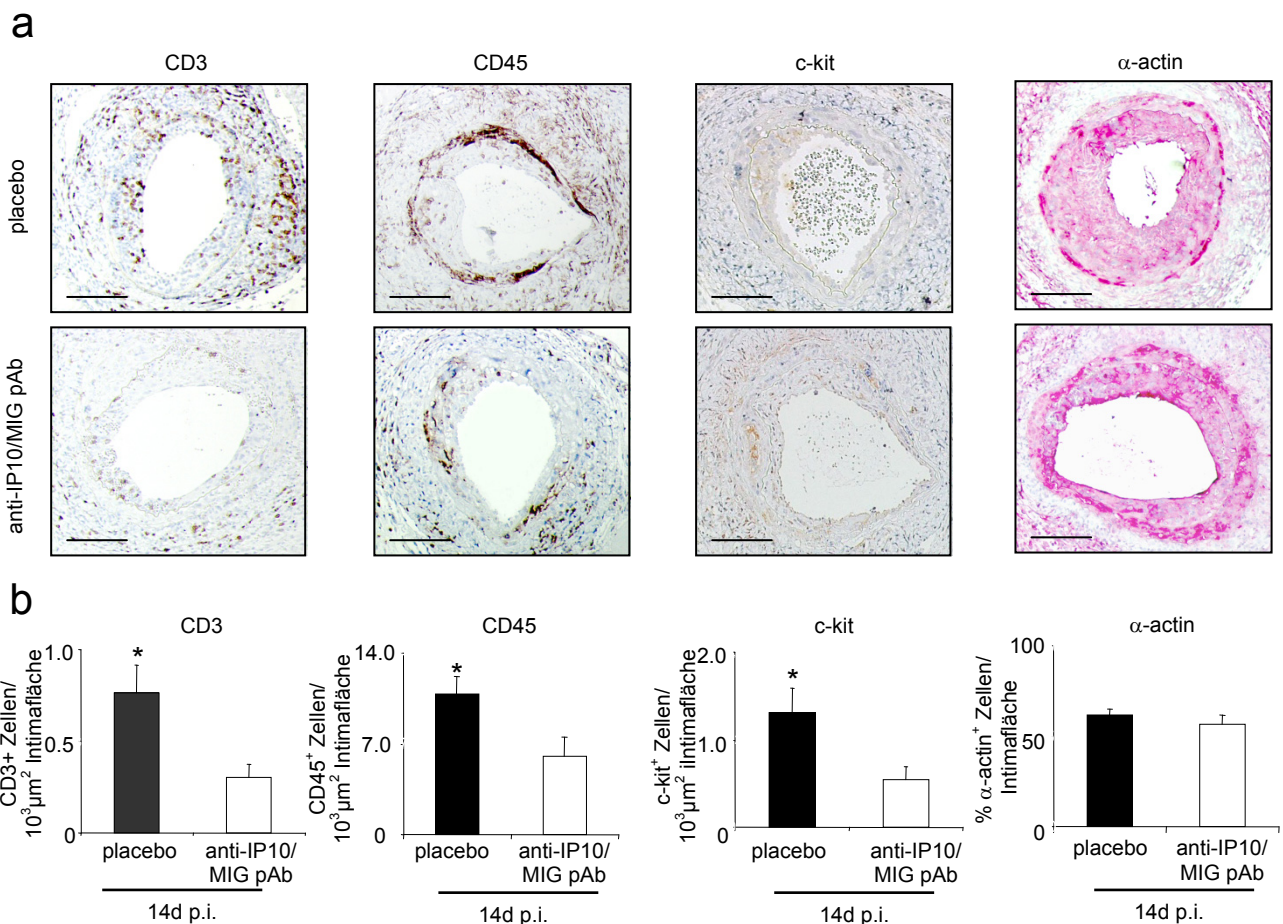
**Abbildung 27:** Korrelation zwischen Intimahyperplasie und Rekrutierung von CD3<sup>+</sup> Zellen (WT vs CXCR3<sup>-/-</sup>)



### 3.4.4.2 Verminderte Inflammation und reduzierte Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellen nach anti-IP10/MIG-pAb-Behandlung

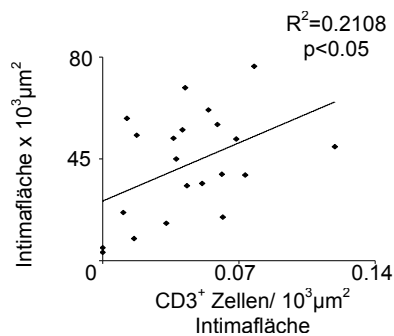
Wie die immunhistochemische Analyse der CXCR3<sup>-/-</sup>-Mäuse erkennen lässt, spielt die CXCR3-Achse eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Zellen zur Stelle der Gefäßverletzung. Die Mäuse, bei denen durch Gabe des polyklonalen Antikörpercocktails die beiden CXCR3-Liganden IP10 und MIG blockiert werden, zeigen ebenfalls eine reduzierte Entzündungsreaktion. Das belegt die signifikante Reduktion von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen und CD45<sup>+</sup>-Leukozyten in der Intima im Vergleich zu Placebo-behandelten Mäusen 14d nach Gefäßverletzung.

Die Rekrutierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in den anti-IP10/MIG-pAb behandelten Mäusen ist im Vergleich zu den Placebo-behandelten Mäusen reduziert. Am Anteil der glatten Muskelzellen ist kein Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen festzustellen.



**Abbildung 28: Immunhistochemische Analyse der zellulären Zusammensetzung der intimalen Hyperplasie 14d nach Gefäßverletzung in 129S1/SvIMJ-Mäuse,**

von denen eine Gruppe mit einem Placebo und eine andere Gruppe mit einem neutralisierenden Antikörper gegen IP10 und MIG behandelt wurden. (a) Repräsentative Bilder der jeweiligen immunhistochemischen Färbungen (Maßstabsbalken=100µm). (b) Quantitative Auswertung der Immunhistochemie für T-Zellen (CD3), Leukozyten (CD45), hämatopoetische Vorläuferzellen (c-kit) und glatte Muskelzellen ( $\alpha$ -actin), (Mittelwert  $\pm$  SEM, n=8 je Gruppe,  $\ast=p<0,05$  vs. Placebo behandelten Mäusen).

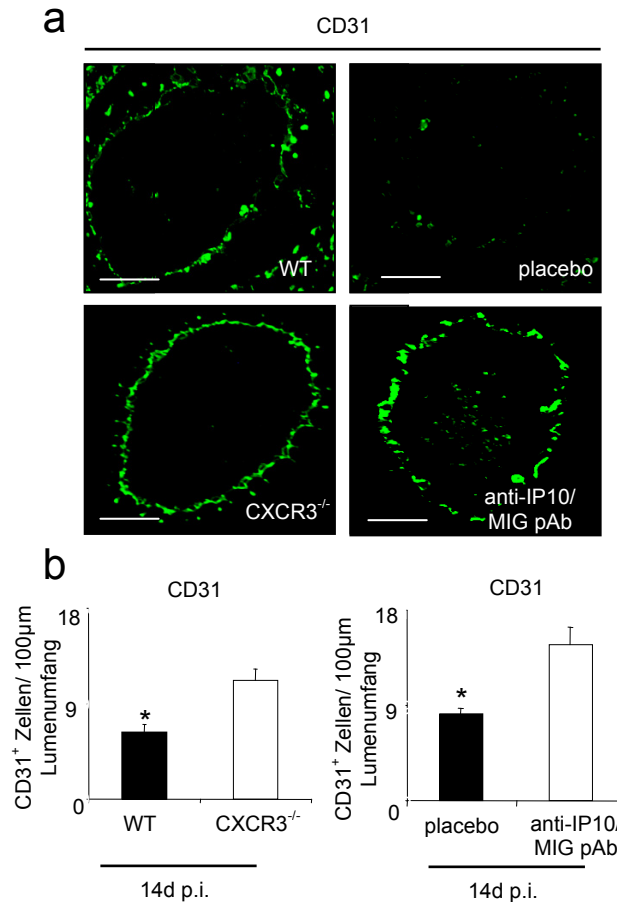


**Abbildung 29:** Korrelation zwischen Intimahyperplasie und Rekrutierung von CD3<sup>+</sup> Zellen (Placebo vs. anti-IP10/ anti-MIG pAb)

### 3.4.5 Reduktion der Reendothelialisierung nach Gefäßverletzung durch IP10 und MIG

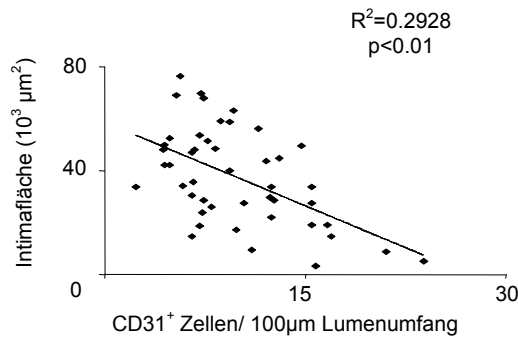
Eine schnelle Reendothelialisierung ist für den Heilungsprozess nach Gefäßverletzung ein entscheidendes Qualitätsmerkmal, da sie zur Verminderung der Restenoserate und bei Stentimplantationen zur Senkung des Risikos für eine späte Stentthrombose führt (LUSCHER et al. 2007).

CXCR3<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen in der immunhistochemischen Auswertung eine signifikant verbesserte Reendothelialisierung auf, was durch die Färbung des Endothelmarker CD31 gezeigt werden kann. Dies lässt vermuten, dass das Fehlen von CXCR3 die anti-angiogenetischen Effekte von IP10 aufhebt (LUSTER et al. 1995; BELPERIO et al. 2000; ROMAGNANI et al. 2001; BODNAR et al. 2006). Dementsprechend ist auch die Reendothelialisierung der Mäuse, die mit dem neutralisierenden Antikörper gegen IP10 und MIG behandelt wurden, signifikant verbessert.



**Abbildung 30: Immunhistochemische Analyse der Reendothelialisierung, dargestellt durch die Färbung des Endothelmarkers CD31. (a) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen der jeweiligen verletzten Gefäße (Maßstabsbalken=100µm). (b) Statistische Quantifizierung von CD31<sup>+</sup>-Endothelzellen (Mittelwert ± SEM, n=8 je Gruppe, \*=p<0,05 vs. Wildtyp oder Placebo-behandelte Mäuse). Die Reendothelialisierung ist in den verletzten Gefäßen der Wildtyp und Placebo-behandelten Mäuse vermindert und im Vergleich dazu in den CXCR3<sup>-/-</sup>-Mäusen und den anti-IP10/MIG pAb-behandelten Mäusen verbessert.**

Dass eine schnelle Reendothelialisierung nach Gefäßverletzung anti-proliferative Eigenschaften hat, zeigt auch die negative Korrelation zwischen dem Ausmaß der intimalen Hyperplasie und dem Grad der Reendothelialisierung ( $R^2=0,2928$ ,  $p<0,01$ ) (NÜHRENBURG et al. 2007). Je schneller es zur Reendothelialisierung kommt, desto geringer ist der Ausmaß der Intimahyperplasie.



**Abbildung 31:** Analyse der Korrelation zwischen dem Grad der Reendothelialisierung (CD31<sup>+</sup> Zellen) und dem Ausmaß der Intimahyperplasie (Intimale Fläche (μm<sup>2</sup>)).

### 3.4.6 Aktivierung der pro-inflammatorischen Chemokine EMAP-II und SDF-1α durch Gefäßverletzung

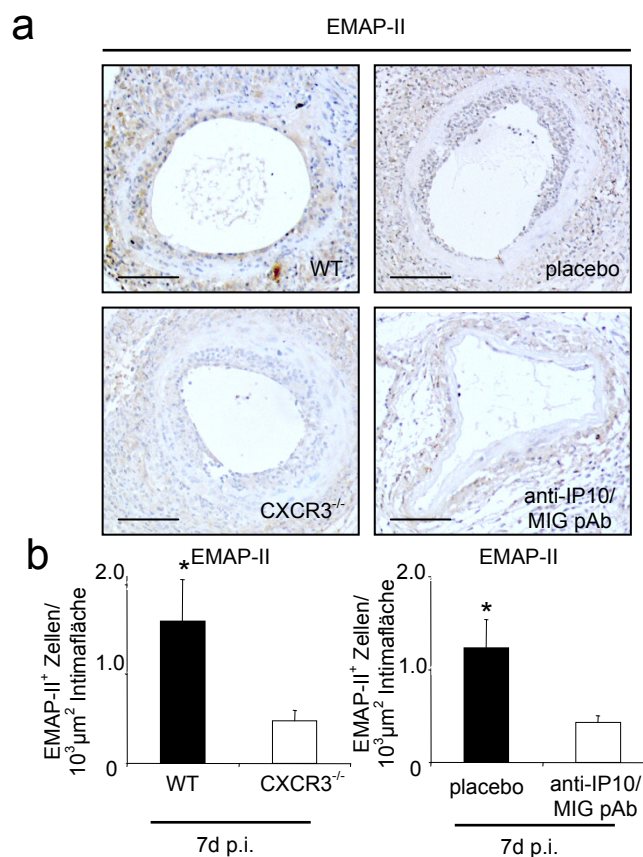
Zur Identifizierung der zugrundeliegenden molekularen Veränderungen, die für die tiefgreifenden Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung verantwortlich sind, wird der Effekt der CXCR3-Blockade auf zwei Hauptagonisten der Gefäßinflammation untersucht.

#### 3.4.6.1 Aktivierung von EMAP-II durch die CXCR3-Achse

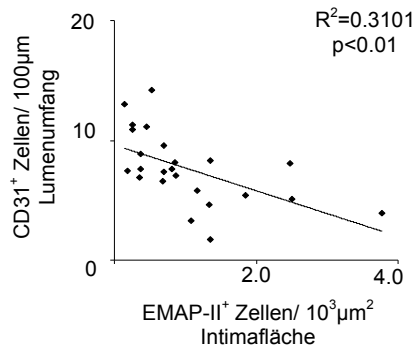
Eines dieser pro-inflammatorischen Chemokine, welches in der Pathogenese von vasoproliferativen Gefäßerkrankungen eine entscheidende Rolle spielt, ist endothelial-monocyte-activating-polypeptide (EMAP)-II (ZOHLNHÖFER et al. 2004; NÜHRENBURG et al. 2005; NÜHRENBURG et al. 2007). EMAP-II ist sehr stark mit der Gefäßinflammation assoziiert und darüber hinaus dafür bekannt, während der Apoptose durch die Abspaltung von pro-EMAP-II durch das Enzym Caspase-7 aktiviert zu werden und die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen mittels seiner chemotaktischen Eigenschaften zu beschleunigen (KAO et al. 1992; KAO et al. 1994; KNIES et al. 1998; DAEMEN et al. 1999). Zudem besitzt EMAP-II anti-angiogenetische Eigenschaften, die durch die pro-apoptotischen Eigenschaften auf Endothelzellen hervorgerufen werden (SCHWARZ et al. 1999; BERGER et al. 2000). Aus diesem Grund ist es von Interesse, welche Effekte die CXCR3-Achse für die Expression von EMAP-II hat. CXCR3<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen im Vergleich zu den WT-

Mäusen eine deutlich verringerte EMAP-II-Proteinexpression 7d nach der Gefäßverletzung (Abb. 32). Vergleichbare Ergebnisse erhält man durch die Behandlung der Mäuse mit dem neutralisierenden Antikörpercocktail gegen IP10 und MIG.

Übereinstimmend mit Daten, die zeigen, dass EMAP-II pro-apoptotische Effekte auf Endothelzellen hat, korreliert die Reendothelialisierung ( $CD31^{+}ECs$ ) negative linear mit der Expression von EMAP-II ( $R^2=0,3101$ ,  $p<0,01$ ; Abb. 33) (SCHWARZ et al. 1999; BERGER et al. 2000).



**Abbildung 32: (a) Repräsentative Paraffinschnitte von verletzten murinen Femoralisarterien, die gegen EMAP-II immunhistochemisch gefärbt wurden (Maßstabsbalken=100μm). (b) Quantitative Analyse der Immunhistochemie für EMAP-II (Mittelwert ± SEM, n=8 je Gruppe, \*=p<0,05 vs. WT oder Placebo-behandelte Mäuse).**



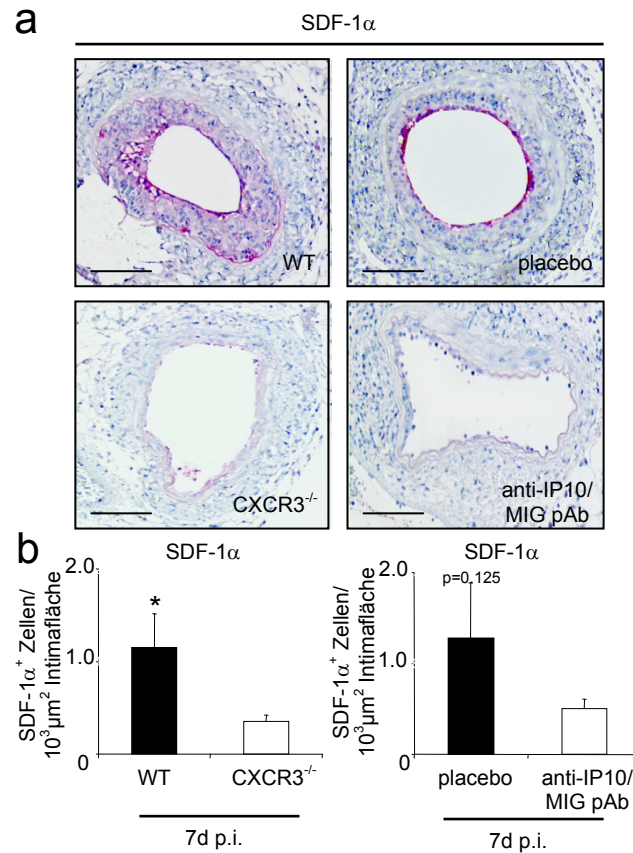
**Abbildung 33: Negative lineare Korrelation zwischen der EMAP-II-Proteinexpression und dem Grad der Reendothelialisierung.**

#### **3.4.6.2 Reduzierte SDF-1 $\alpha$ Aktivierung durch Blockade von CXCR3**

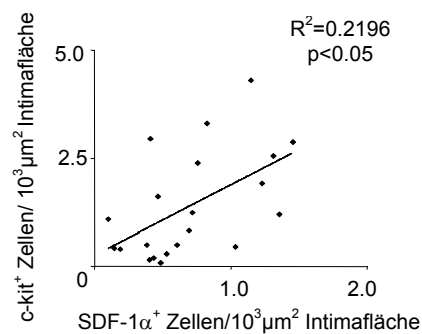
Ein weiteres pro-inflammatorisches Chemokin, das an dem Prozess der vaskulären Inflammation nach Gefäßverletzung beteiligt ist, ist das CXCR4-Chemokin SDF-1 $\alpha$  (ABI-YOUNES et al. 2000). Vergleichbar mit dem Chemokin EMAP-II führt die initiale Apoptose nach Gefäßverletzung in den medialen glatten Muskelzellen zur Ausschüttung von SDF-1 $\alpha$ . Diese spielt eine entscheidende Rolle bei der Initiierung von vaskulären Reparaturprozessen und führt ultimativ zur Intimahyperplasie (ZERNECKE et al. 2005).

Die Analyse der SDF-1 $\alpha$ -Expression nach Gefäßverletzung zeigt eine deutliche luminale Freisetzung dieses Chemokins (Abb. 34). Die genetische und antikörpervermittelte Blockierung der CXCR3-Achse führt zu einer signifikant verringerten SDF-1 $\alpha$ -Proteinexpression in der Gefäßwand im Vergleich zu den WT- oder Placebo-behandelten Mäusen (Abb. 34).

Darüber hinaus korreliert die SDF-1 $\alpha$ -Freisetzung nach Gefäßverletzung signifikant positiv mit der Rekrutierung von hämatopoetischen Zellen (gezeigt durch c-kit<sup>+</sup> Zellen, R<sup>2</sup>=0,2196, p<0,05; Abb. 35).



**Abbildung 34: (a) Repräsentative Paraffinschnitte von verletzten murinen Femoralisarterien, die gegen SDF-1 $\alpha$  immunhistochemisch gefärbt wurden (Maßstabsbalken=100µm). (b) Quantitative Analyse der Immunhistochemie für SDF-1 $\alpha$  (Mittelwert  $\pm$  SEM, n=8 je Gruppe, \*= $p$ <0,05 vs. Wildtyp oder Placebo-behandelten-Mäuse).**



**Abbildung 35: Positive lineare Korrelation zwischen der verletzungsinduzierten SDF-1 $\alpha$ -Freisetzung und der Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellen (c-kit<sup>+</sup>-Zelle) an die Stelle der Gefäßverletzung.**

### 3.4.7 Reduktion der verletzungsinduzierten Apoptose durch die Blockade der CXCR3-Achse

Eine der ersten Reaktionen auf die Gefäßverletzung ist die Apoptose vaskulärer Zellen (SATA et al. 2000). Dieser Vorgang ist stark mit der Aktivierung von Proliferation in glatten Muskelzellen korreliert (ZERNECKE et al. 2005). Die Hemmung der Apoptose, die ebenso einen Auslöser für die arterielle Inflammation darstellt, führt im weiteren Verlauf zur Verminderung des Ausmaßes der Intimahyperplasie (BEOHAR et al. 2004).

Zusätzlich zu den chemotaktischen Eigenschaften der CXCR3-Liganden, ist beschrieben worden, dass IP10 und MIG auch an der Apoptoseinduktion beteiligt sind (ZHANG et al. 2005; SUZUKI et al. 2007).

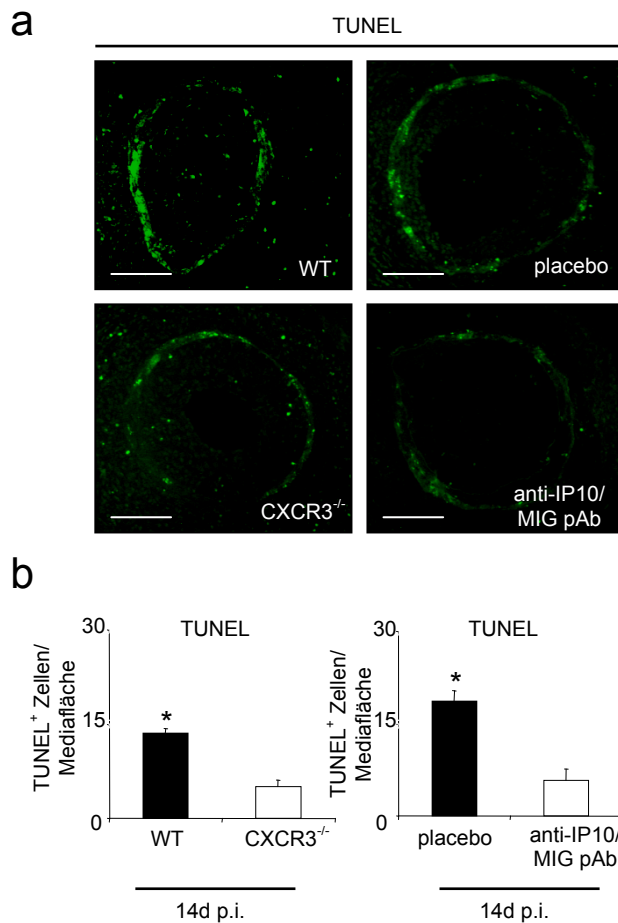
Unsere Daten bezüglich der Proteinexpression der beiden apoptoseinduzierten Chemokine EMAP-II und SDF-1 $\alpha$  deuten auf eine Beteiligung der CXCR3-Achse an der Regulation der Apoptose in medialen Zellen nach Gefäßverletzung hin. Folglich wird der Effekt der CXCR3-Blockierung auf das Ausmaß der Apoptose nach Gefäßverletzung mittels TUNEL-Assay und Caspase-3 Färbung analysiert.

Die arterielle Drahtverletzung induziert eine starke apoptotische Antwort in den Gefäßzellen. Der Einfluss der CXCR3-Achse führt zur signifikanten Reduktion der vaskulären Apoptose. So zeigen die murinen Gefäße der CXCR3<sup>-/-</sup>-Mäuse und anti-IP10/anti-MIG-pAb-behandelten Mäuse eine signifikante Verminderung der apoptotischen Reaktion im TUNEL-Assay im Vergleich zu den WT- oder Placebo-behandelten Mäusen (Abb. 36).

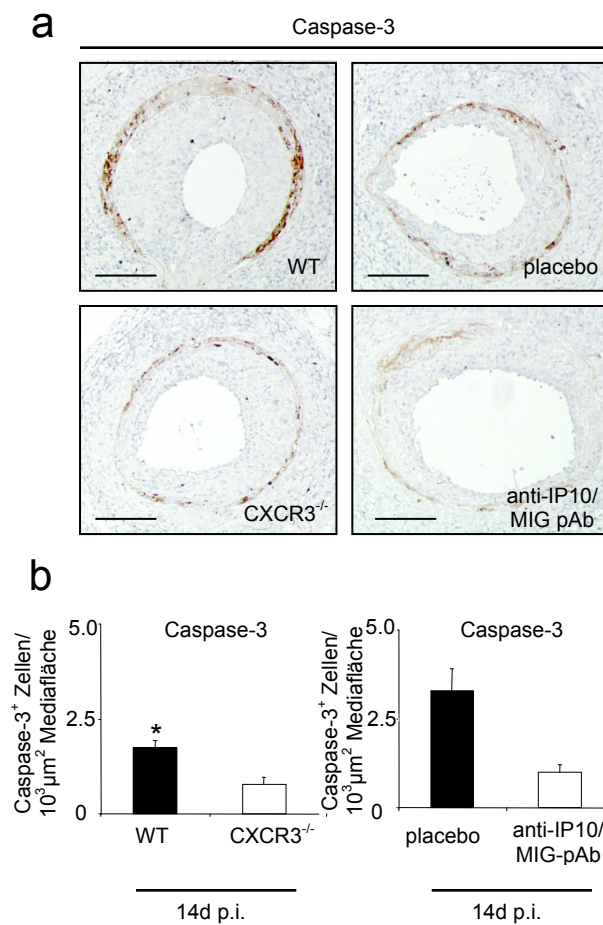
Diese Daten werden weiterhin durch die signifikante Reduktion von Caspase-3 positiven Zellen in den CXCR3<sup>-/-</sup>-Mäusen und anti-IP10/anti-MIG pAb-behandelten Mäusen bestärkt (Abb. 37).

Vergleicht man das Ausmaß der Apoptose (dargestellt durch TUNEL<sup>+</sup>-apoptotische-Zellen) mit dem Ausmaß der Th1-vermittelten Inflammation (anhand von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen) erhält man eine signifikante positive Korrelation der apoptotischen Reaktion mit dem Grad der Th1-vermittelten Immunantwort ( $R^2=0,4095$ ),  $p<0,01$ ; Abb. 38).

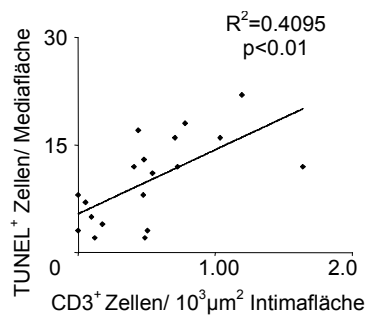




**Abbildung 36:** Zur Untersuchung der Rolle der CXCR3-Achse in der verletzungsinduzierten Apoptose von Gefäßzellen wird ein TUNEL-Assay in WT-, CXCR3<sup>-/-</sup>, placebo-behandelten und anti-IP10/anti-MIG-pAb-behandelten Mäusen 14d nach Gefäßverletzung durchgeführt. (a) Repräsentative Gefäßschnitte von verletzten murinen Femoralisarterien, die mittels TUNEL-Assay auf apoptotische Zellen gefärbt wurden (Maßstabsbalken=100µm). (b) Quantitative Analyse des TUNEL-Assays (Mittelwert ± SEM, n>8 je Gruppe, \*=p<0,05 vs. WT- oder Placebo behandelte Mäuse).



**Abbildung 37: Caspase-3-Färbung zur Bekräftigung der Ergebnisse des TUNEL-Assays. (a) Repräsentative Gefäßschnitte von verletzten murinen Femoralisarterien, die mittels Caspase-3 auf apoptotische Zellen gefärbt wurden (Maßstabsbalken=100μm). (b) Quantitative Analyse der immunhistochemischen Caspase-3-Färbung (Mittelwert ± SEM, n>8 je Gruppe, \*=p<0,05 vs. WT- oder Placebo-behandelte Mäuse).**



**Abbildung 38: Statistische Korrelation der TUNEL-positiven apoptotischen Zellen mit der Th1-Immunantwort 14d nach Gefäßverletzung, (n=19, p<0,05).**

### 3.4.8 Induktion von Apoptose und ROS-Bildung in Endothelzellen und Monozyten durch IP10

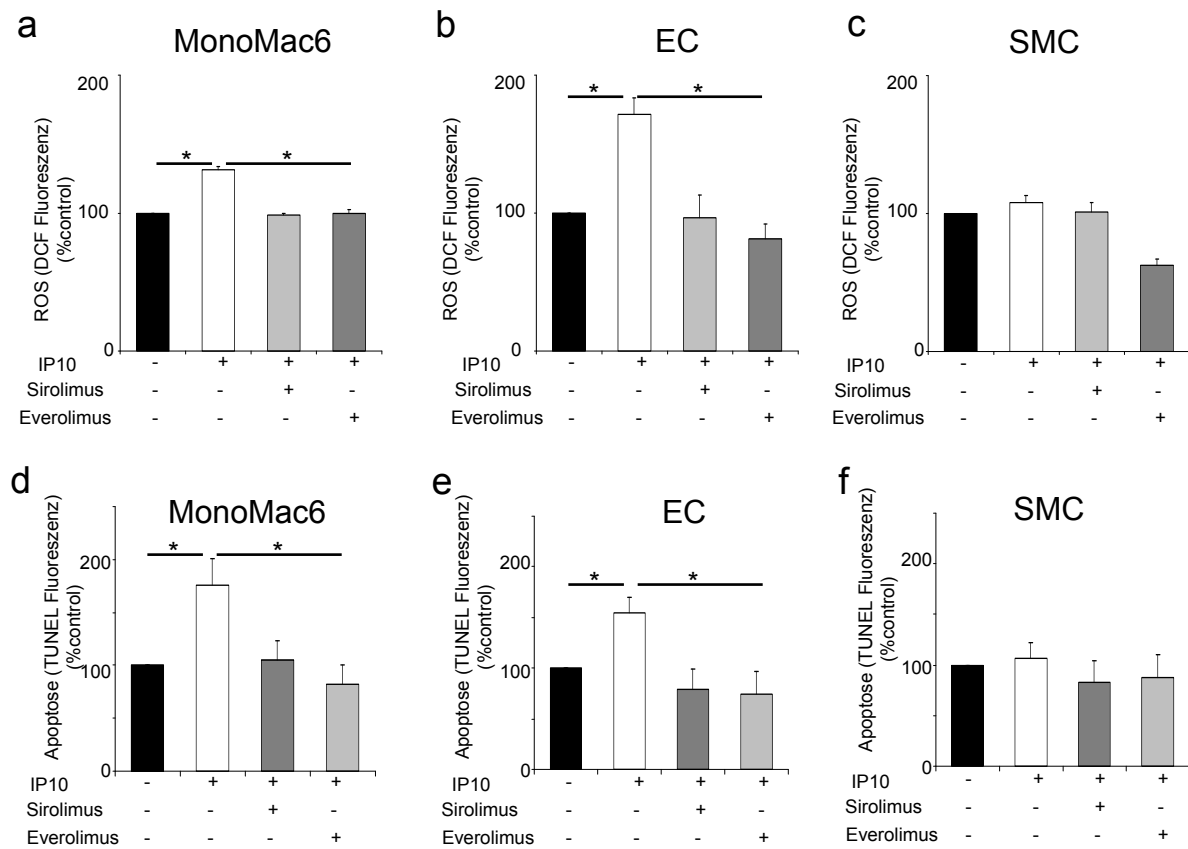
Bisher ist wenig bekannt über die molekularen Mechanismen, welche die frühe Apoptose von Gefäßzellen nach Verletzung verursachen. Neuere Daten sprechen dafür, dass die Aktivierung der mTORC1-Kinase nicht nur an der Regulation von proliferativen Prozessen beteiligt ist, sondern auch die Apoptose von vaskulären Zellen steuert. Die Hemmung des mTORC1-Signaltransduktionsweges durch das Rapamycinderivat Sirolimus reduziert signifikant die Apoptoseaktivierung in glatten Muskelzellen (ZOHLNHÖFER et al. 2004). Außerdem zeigen kürzlich veröffentlichte Daten aus einem Mausmodell, dass die Blockierung des mTORC1-Signalweges durch ein anderes Rapamycin-Analog, Everolimus, nicht nur in einer Verminderung der intimalen Hyperplasie resultiert, sondern auch signifikant die Apoptose von intimalen Zellen verhindert und folglich die EMAP-II-Expression nach Gefäßverletzung unterdrückt (NÜHRENBURG et al. 2007).

Um die Rolle der mTORC1-Kinase im CXCR3-Signaltransduktionsweg zu klären, untersuchen wir *in vitro* den Effekt von IP10 auf Apoptose und ROS-Bildung in glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Monozyten. Die Bildung von Sauerstoffradikalen während der Gefäßverletzung ist ein bekannter Mechanismus und führt zur Aktivierung von Apoptose in Gefäßzellen (LI et al. 1997; BEK et al. 2003; GRIENDLING u. FITZGERALD 2003; MADAMANCHI u. RUNGE 2007). In Abbildung 39 ist zu sehen, wie die Stimulierung von Monozyten und Endothelzellen durch IP10 zu einer signifikanten ROS-Generierung ( $p < 0,05$  vs. Baseline, Abb. 39 a, b) und Apoptose-Aktivierung ( $p < 0,05$  vs. Baseline, Abb. 39 d, e) führt.

Im Gegensatz dazu kommt es bei der Stimulierung von glatten Muskelzellen durch IP10 weder zur ROS-Generierung, noch zur Apoptoseaktivierung (Abb. 39 c, f). Unsere Hypothese, dass die mTORC1-Aktivierung in den Signaltransduktionsweg involviert ist, wird dadurch gestützt, dass es durch die pharmakologische Inhibierung der mTORC1-Kinase mittels der Rapamycin-Analoga Sirolimus und Everolimus weder zur ROS-Generierung noch zur Aktivierung von Apoptose kommt (Abb. 39 a, b, d, e).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die vorliegenden Ergebnisse dafür sprechen, dass die Interaktion zwischen IP10 und CXCR3 auf Gefäßzellen wie

Monozyten und Endothelzellen zur Aktivierung der mTORC1-Kinase führt, was wiederum die ROS-Generierung und Apoptoseaktivierung zur Folge hat.



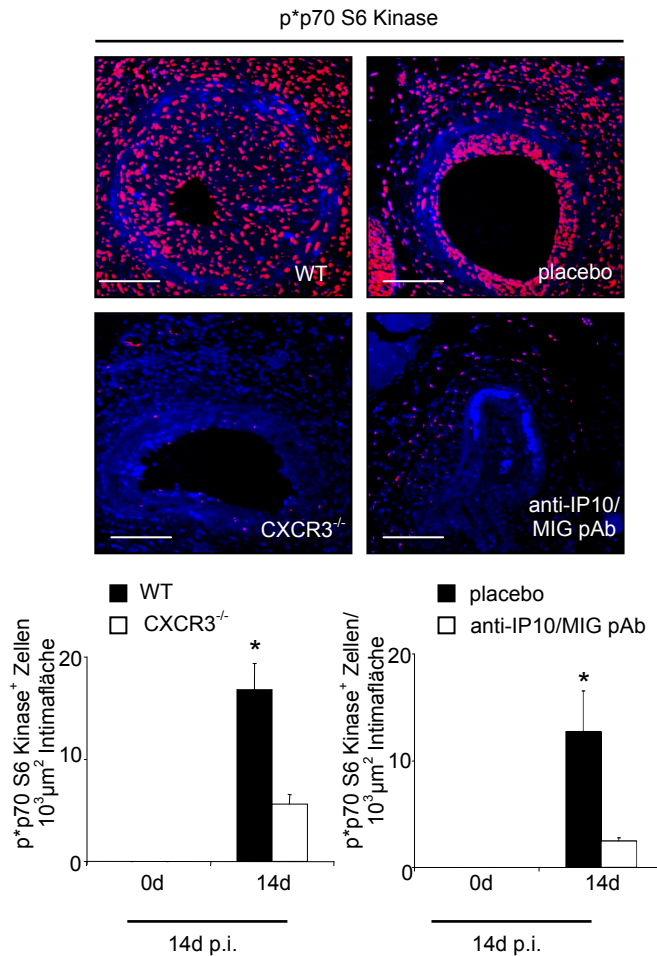
**Abbildung 39:** Um die Rolle der mTORC1-Kinase in der CXCR3-vermittelten Signaltransduktion genauer zu untersuchen, werden Monozyten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen mit IP10 stimuliert und sowohl die ROS-Generierung (obere Reihe) untersucht als auch die Aktivierung von Apoptose (untere Reihe) analysiert. IP10 induziert signifikant die Bildung von ROS in (a) Monozyten, und (b) Endothelzellen über einen mTORC1-abhängigem Signaltransduktionsweg, da Sirolimus und Everolimus die Effekte verhindern konnten (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $*=p<0,05$  vs. % Kontrolle, Ergebnisse aus 3 unabhängige Versuchsansätze). Die ROS-Generierung in glatten Muskelzellen kann nicht durch IP10 stimuliert werden. (c) Außerdem induziert IP10 signifikant die Apoptose in (d) Monozyten und (e) Endothelzellen. Auch dieser Effekt ist mTORC1-abhängig, da er durch die pharmakologische Inhibierung von Sirolimus und Everolimus gehemmt werden kann (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $*=p<0,05$  vs. % Kontrolle, Ergebnisse aus 3 unabhängige Versuchsansätze). (f) In glatten Muskelzellen kann keine Apoptose durch IP10-Stimulierung hervorgerufen werden. Jede Probe wird durch Messung der Alamar Blue-Absorption normalisiert.

### 3.4.9 Aktivierung von mTORC1 durch Gefäßverletzung über die CXCR3-Achse

Zur Bestätigung unserer Hypothese, dass die beiden Chemokine IP10 und MIG an der Aktivierung der mTORC1-Kinase nach Gefäßverletzung beteiligt sind, untersuchen wir die Aktivierung der mTORC1-nachgeschalteten p70 S6 Kinase im murinen Femoralisverletzungsmodell *in vivo*.

Abbildung 40 zeigt, dass eine Gefäßverletzung zu einer starken Aktivierung des mTORC1-Signalweges führt, was durch die Phosphorylierung und damit Aktivierung der nachgeschalteten Kinase p70 S6 gezeigt werden kann. Die genetische Deletion von CXCR3 oder die Neutralisierung der beiden CXCR3 Chemokine IP10 und MIG durch polyklonale Antikörper bewirken eine signifikant verminderte Phosphorylierung der p70 S6 Kinase an der Stelle der Gefäßverletzung ( $p < 0,05$  vs. WT oder Placebo behandelten Mäusen, Abb. 40 a, b).

Diese Ergebnisse deuten auf eine zentrale Rolle der Th1-vermittelten Aktivierung der mTORC1-Kinase hin.



**Abbildung 40:** Um den Effekt der beiden CXCR3-Chemokine IP10 und MIG nach Gefäßverletzung *in vivo* auf die mTORC1-Aktivierung zu analysieren, wird die Aktivierung der nachgeschalteten p70 S6 Kinase in Immunfluoreszenzfärbungen dargestellt und quantifiziert.

(a, b) Die Phosphorylierung der p70 S6 Kinase ist ebenso 14d nach Gefäßverletzung in den WT- und Placebo-behandelten Mäusen signifikant hochreguliert. Hingegen führt die CXCR3-Defizienz oder die Neutralisierung von IP10 und MIG durch Antikörper zur verminderten Phosphorylierung der p70 S6 Kinase. (a) Repräsentative Gefäßschnitte von verletzten murinen Femoralisarterien, die auf p\*p70 S6 Kinase gefärbt sind (Maßstabsbalken = 100µm). (b) Quantitative Analyse der p\*p70 S6 Kinase-Immunfluoreszenzfärbung (Mittelwert ± SEM, n=8 je Gruppe, \*= $p < 0,05$  vs. WT- oder Placebo behandelte Mäuse).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass es durch die CXCR3-Chemokine IP10 und MIG nicht nur zur Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup>-Zellen an die Stelle der Gefäßverletzung kommt, sondern dass sie auch eine wichtige Funktion bei der

## **EIGENE UNTERSUCHUNGEN**

---

Aktivierung der hochkonservierten mTORC1-Kinase während der Gefäßverletzung einnehmen.

### **4 DISKUSSION**

#### **4.1. Das Versuchsmodell**

##### **4.1.1 Intimahyperplasie nach intraluminaler Gefäßverletzung in der Maus**

Die Aufweitung stenosierter koronarer Gefäßabschnitte durch PTCA-Stenting hat sich zu einer sicheren und effektiven Behandlungsmethode entwickelt. Nach wie vor sind jedoch die Langzeitergebnisse derartiger Interventionen durch Rezidivraten limitiert, wobei hier als Hauptursache die Entwicklung einer Intimahyperplasie zu nennen ist.

Um neue Therapieformen zu entwickeln, die die Entstehung der Intimahyperplasie verhindern können, ist es unerlässlich, auf umfassende molekulare Erkenntnisse über die in der Arterienwand ablaufenden Reparatur- und Remodelingprozesse zurückgreifen zu können.

Das Tiermodell bei der Maus hat diesbezüglich mehrere wesentliche Vorteile: Zunächst können durch gentechnische Manipulation transgene Tiere gezüchtet werden, wodurch der Einfluss eines speziellen Proteins in der molekularen Entstehung der Intimahyperplasie untersucht werden kann (FUSTER et al. 1998). Zusätzlich bietet das murine Femoralisverletzungsmodell die Vorteile der leichten Anwendung von pharmakologischen Substanzen, der einfachen Handhabung und der großen biologischen Verfügbarkeit (MULLER et al. 1992). In dieser Studie werden Mäuse genutzt, die durch genetische Manipulation eine CXCR3-Defizienz aufweisen (HANCOCK et al. 2000). Zusätzlich verfolgen wir einen therapeutischen Strategie, bei dem wir den Mäusen subkutan einen Antikörpercocktail gegen IP10 und MIG applizieren. Diese systemische Injektion stellt keinen großen Eingriff dar, so dass dieses Experiment leicht zu reproduzieren und ohne große Varianzen durchführbar ist.

Ein chirurgischer Eingriff liegt hier in Form einer experimentell induzierten Gefäßverletzung vor. Da eine transluminale Gefäßverletzung mit einem Ballon bei der Maus wegen der geringen Größe des Gefäßes nicht möglich ist, findet in dieser Studie ein experimentelles Restenosemodell mit einem Draht Anwendung (SATA et al. 2000). Dabei handelt es sich um ein Modell mit einer fibromuskulären Komponente der Restenose und somit um eine experimentelle Umsetzung der



sogenannten „Response-to-injury“-Hypothese (KANTOR et al. 1999). Dieses Modell wurde entwickelt, um an genetisch modifizierten Mäusen die molekularen Mechanismen bei einer Intimahyperplasie zu untersuchen. Dabei wird in diesem Versuchsmodell durch Denudation und Dilatation in der murinen A. Femoralis die Bildung einer homogenen Intimahyperplasie induziert (SATA et al. 2000). Es handelt sich dabei um einen einfachen Eingriff, da die Arterie, die als Schleuse genutzt wird um die Femoralisarterie zu verletzen, oberflächlich an der Innenseite der Hinterläufe liegt. Wegen der gut etablierten Injektionsanästhesie und der ständigen Wärme- und Sauerstoffzufuhr können Anästhesiez Zwischenfälle ausgeschlossen werden

Im Gegensatz zu anderen Modellen bleibt nach der Verletzung, wie beim Menschen, der Blutfluss im Gefäß erhalten (KUMAR u. LINDNER 1997; ROQUE et al. 2000). Zusätzlich entspricht die A. Femoralis in ihrer morphologischen Struktur den Koronargefäßen des Menschen. Beide sind Gefäße des muskulösen Bautyps (MULLER et al. 1992; KANTOR et al. 1999). Der Vorteil dieses Modells gründet sich darauf, dass weitergehend isoliert einzelne Komponenten der Restenose wie Aktivierung, Migration, Reendothelialisierung und Proliferation von glatten Muskelzellen untersucht werden können. Allerdings sind die so erhobenen Daten aufgrund der fehlenden Komplexität der behandelten Läsion nicht unmittelbar auf den Mensch übertragbar, da im Gegensatz zu der humane atherosklerotischen Erkrankung die Gefäßverletzung in einem gesunden Gefäß ausgelöst wird.

### **4.2. mTOR-Aktivierung durch die CXCR3-Liganden IP10 und MIG als zentraler Mechanismus bei kardiovaskulären Erkrankungen**

Die CXCR3-Chemokine IP10 und MIG nehmen eine entscheidende Rolle in der Chemotaxis von T-Zellen und der Th1-vermittelten Immunantwort nach Gefäßverletzung ein. Mit dieser Studie zeigen wir einen neuen und unerwarteten Mechanismus dieser Chemokine in der Aktivierung der hochkonservierten und essentiellen mTORC1-Kinase. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass IP10 und MIG entscheidend bei der Aktivierung von mTORC1 beteiligt sind und auf diesem Weg sowohl zur Generierung von Sauerstoffradikalen als auch zur Apoptose in vaskulären Zellen führen. Dementsprechend kommt es durch die Blockierung der CXCR3-Achse in der Maus zu einer verminderten mTORC1-Aktivierung nach der Gefäßverletzung. Die IP10/MIG vermittelte mTORC1-Aktivierung resultiert in multifaktoriellen Prozessen, die (1) zur Stimulation von oxidativem Stress und Apoptose in Gefäßzellen, (2) zur Initiierung einer erheblichen Immunantwort, sowie (3) zur Freisetzung der CXC-Chemokine SDF-1 $\alpha$  und EMAP-II führen. Dadurch kommt es (4) zur Rekrutierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen und (5) zur Hemmung der Reendothelialisierung. Zusammenfassend erläutert diese Studie die Rolle der Th1 Chemokine IP10 und MIG in der Pathophysiologie von kardiovaskulären Erkrankungen und zeigt, wie fundamental die Rolle der Th1-Immunantwort für Reparatur- und Regenerationsprozesse nach Gefäßverletzung ist. Zusätzlich liefert die Studie Erkenntnisse zur Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien, die auf der Hemmung der CXCR3-Achse beruhen könnten.

#### **4.2.1 Der Einfluss der CXCR3-Chemokine IP10 und MIG auf Inflammation und Rekrutierung von Vorläuferzellen nach Gefäßverletzung**

Neuere Studien liefern Anhaltspunkte, dass sowohl die beiden Chemokine IP10 und MIG, als auch der dazugehörige Rezeptor CXCR3 eine entscheidende funktionelle Rolle in der Chemotaxis von T-Zellen in chronischen inflammatorischen Erkrankungen einnehmen (LUSTER et al. 1995; XIE et al. 2003; PIPER et al. 2007). Mit dieser Studie können wir direkt zeigen, dass die CXCR3-Chemokine IP10 und MIG wesentlich an den vaskulären Reparatursmechanismen und an den pathologischen Remodelingvorgängen beteiligt sind.

Zunächst regulieren IP10 und MIG in ihrer Funktion als Chemokine die frühe Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup>-T-Zellen an die Stelle der Gefäßverletzung. Die beiden Chemokine IP10 und MIG sind sehr bald nach der Gefäßverletzung hochreguliert und resultieren in der Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup>-T-Zellen. Umgekehrt führt die Abwesenheit des CXCR3-Rezeptors oder die Neutralisierung der beiden Liganden IP10 und MIG signifikant zur Reduzierung der Immunantwort und hemmt die Bildung der Intimahyperplasie nach Gefäßverletzung. Interessanterweise wird durch die CXCR3-Defizienz nicht nur die Rekrutierung von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen beeinflusst, sondern es kommt zusätzlich noch zu einer Reduzierung von CD45<sup>+</sup>-Leukozyten. Die Relevanz dieses regulierenden Effektes der CXCR3-Achse auf die Immunantwort spiegelt sich in einer positiven Korrelation zwischen dem Ausmaß der Th1-Immunantwort und dem Grad der Intimahyperplasie nach Endotheldenudation wieder.

Neben der Inflammation ist für vaskuläre Heilungs- und Reparaturprozesse auch die Rekrutierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen von besonderer Bedeutung (SATA et al. 2002; DIMMELER u. ZEIHNER 2004; NÜHRENBURG et al. 2005; ZERNECKE et al. 2005; MASSBERG et al. 2006). So wurde vor kurzem beschrieben, dass das CXCR3-Chemokin SDF-1 $\alpha$  und der dazugehörige Rezeptor CXCR4 eine zentrale Signalachse im „Homing“ von zirkulierenden hämatopoetischen Vorläuferzellen an die Stelle der Gefäßdenudation und -verletzung darstellt (ZERNECKE et al. 2005; MASSBERG et al. 2006). Interessanterweise kommt es vor der SDF-1 $\alpha$ -Expression in medialen glatten Muskelzellen zu apoptotischen Vorgängen, deren Blockade in einer signifikanten Verminderung der SDF-1 $\alpha$  Proteinexpression in der Intimahyperplasie resultiert (ZERNECKE et al. 2005). Durch diese Studie wird dargelegt, dass die CXCR3-Chemokine IP10 und MIG auch direkt in die Rekrutierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen nach Gefäßverletzung involviert sind. Es ist bekannt, dass der CXCR3-Rezeptor auch auf CD34<sup>+</sup>-humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird, und die Adhäsion und Aggregation dieser Zellen reguliert (JINQUAN et al. 2001).

Wie die Doppelimmunfluoreszenzfärbung (Abb. 21) zeigt, exprimieren c-kit<sup>+</sup>-Zellen ebenfalls den Chemokinrezeptor CXCR3 auf ihrer Oberfläche und werden durch die Endotheldenudation an die Stelle der Gefäßverletzung rekrutiert. Sowohl die CXCR3-Deletion als auch die Neutralisierung von IP10 und MIG führen nach der Gefäßverletzung zu einem verminderten Anteil von c-kit<sup>+</sup>-hämatopoetischen Zellen im

intimalen Gewebe. Zudem kommt es in der Abwesenheit der CXCR3-Achse zu einer verringerten Expression von SDF-1 $\alpha$ , was darauf schließen lässt, dass es erst durch den CXCR3-Signalweg zu einer Aktivierung der CXCR4/SDF-1 $\alpha$ -Kaskade nach Gefäßverletzung kommt. Zusammenfassend etablieren diese Daten die CXCR3-Achse als eine Hauptkomponente in der Rekrutierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen während vaskulärer Reparatur- und Remodelingprozesse.

### **4.2.2 Beeinträchtigung der Reendothelialisierung nach der Gefäßverletzung durch IP10 und MIG**

Die Integrität und die funktionelle Aktivität des endothelialen Monolayers haben eine große Bedeutung für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Atherosklerose, transplantationsbedingte Gefäßabstoßungsreaktionen und Restenose (CARMELIET et al. 1997; S. M. SCHWARTZ 1997; CARMELIET 2000; WERNER et al. 2002). Die Verletzung des Endothels initiiert die Proliferation von Endothelzellen und die Rekrutierung von zirkulierenden hämatopoetischen Vorläuferzellen, um das verletzte Endothel wiederherzustellen. Daten dieser Studie sowie Ergebnisse aus anderen Forschungsgruppen legen nahe, dass eine frühe und ausreichende Reendothelialisierung protektive Eigenschaften gegenüber der Ausbildung einer Intimahyperplasie und Gefäßverschlüssen nach Gefäßverletzung besitzt (WALTER et al. 2002; WERNER et al. 2003).

Es ist bekannt, dass CXCR3 nicht nur auf T-Zellen und hämatopoetische Vorläuferzellen exprimiert wird, sondern auch auf Endothelzellen vorkommt (JINQUAN et al. 2001; ROMAGNANI et al. 2001; HILLYER et al. 2003). Zusätzlich ist bereits gezeigt worden, dass die beiden CXCR3-Liganden IP10 und MIG angiostatische Eigenschaften aufweisen (LUSTER et al. 1995; BELPERIO et al. 2000; ROMAGNANI et al. 2001; BODNAR et al. 2006). Unseren Untersuchungen zeigen, dass ein deutlicher Anteil der CXCR3<sup>+</sup>-Zellen, welche an den Ort der Gefäßverletzung rekrutiert werden, Endothelzellen sind. In Übereinstimmung mit den angiostatischen Eigenschaften der CXCR3-Chemokine IP10 und MIG kommt es bei der CXCR3-Deletion oder Neutralisierung der CXCR3-Liganden mit dem Antikörpercocktail gegen die beiden Liganden IP10 und MIG zur verstärkten Reendothelialisierung nach Endotheldenudation. Dieser Effekt beruht auf der

Aufhebung der inhibitorischen Wirkung von IP10 auf das Endothelzellstimulans VEGF.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass eine Gefäßverletzung im Mausmodell zu einer deutlichen Hochregulierung des CXC Chemokins EMAP-II in subendothelialen Leukozyten und glatten Muskelzellen führt (NÜHRENBURG et al. 2007). Neben dem starken chemotaktischen Effekt auf Entzündungszellen besitzt EMAP-II auch anti-angiogenetische Eigenschaften, die sich durch pro-apoptotische Effekte auf Endothelzellen manifestieren (SCHWARZ et al. 1999; BERGER et al. 2000). Dementsprechend ist EMAP-II nicht nur essentiell für die Rekrutierung von Inflammationszellen an den Ort der Gefäßverletzung, sondern verschlechtert auch signifikant die Reendothelialisierung nach Gefäßverletzung im Mausmodell (NÜHRENBURG et al. 2007).

Die EMAP-II Proteinexpression ist nach Gefäßverletzung bei den CXCR3<sup>-/-</sup>-Mäusen ebenso reduziert wie bei den Mäusen, die den Antikörpercocktail gegen IP10 und MIG erhalten haben. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die reduzierte Apoptoserate in den Gefäßzellen zurückzuführen. Auf diese Weise kommt es durch CXCR3-Defizienz zur verbesserten Reendothelialisierung, indem die anti-angiogenetischen Eigenschaften von IP10, MIG und EMAP-II reduziert werden.

### **4.2.3 Die Rolle von mTORC1 bei der Bildung von Sauerstoffradikalen und der Induktion von Apoptose durch IP10 und MIG**

Der Vorgang der Apoptose ist bei kardiovaskulären Erkrankungen sehr stark mit vaskulären Reparaturvorgängen und pathologischen Remodelingprozessen verbunden (SATA et al. 2000; DIMMELER u. ZEHER 2004). Zudem ist bekannt, dass T-Zellen in einem atherosklerotischen Transplantationsmodell den apoptotischen Zelltod durch zytotoxisches Granula und Aktivierung eines rezeptorvermittelten Todessignals induzieren (LEGARE et al. 2000). In unserem Modell kommt es durch die murine Gefäßverletzung ebenso zur starken Aktivierung von Apoptose in den WT- und den Placebo-behandelten Mäusen. Diese apoptotische Reaktion manifestiert sich in der Gefäßwand vor allem in vaskulären Zellen wie glatten Muskelzellen, T-Zellen und Leukozyten. Die Menge der apoptotischen Zellen korreliert hier positiv mit der Anzahl der in die Gefäße

rekrutierten CD3<sup>+</sup>-T-Zellen (Abb. 38). Dies verdeutlicht die fundamentale Rolle der T-Zell-vermittelten Immunantwort bei kardiovaskulären Erkrankungen.

Während der direkt nach der Gefäßverletzung einsetzenden inflammatorischen Reaktion kommt es zur Bildung von Sauerstoffradikalen, die allgemein als pro-apoptotische zelluläre Stimuli bekannt sind (LI et al. 1997; GRIENDLING u. FITZGERALD 2003; MADAMANCHI u. RUNGE 2007). Besonders die Behandlung von Endothelzellen und Monozyten mit IP10 führt zur signifikant verstärkten ROS-Generierung und zur signifikanten Aktivierung von Apoptose in unserem *in vitro* Modell in dieser Studie (Abb. 39).

Um welchen gemeinsamen zugrundeliegenden molekularen Mechanismus handelt es sich jedoch bei den durch die CXCR3-Achse vermittelten Effekten?

Die mTOR-Kinase ist Bestandteil eines Proteinkomplexes, der an unterschiedliche Signalwege von Wachstumsfaktoren, Energiehaushalt und Sauerstoffgehalt in der Zelle beteiligt ist und Zellwachstum, Zellzyklus sowie Apoptose steuert (WULLSCHLEGER et al. 2006). Bei Patienten mit atherosklerotischen koronaren Gefäßerkrankungen ist die Aktivierung des mTOR Signalweges in intimalen Zellen beschrieben worden (ZOHLNHÖFER et al. 2004). Der mTOR-Signalweg ist durch zwei voneinander getrennte Multiproteinkomplexe vermittelt (LOEWITH et al. 2002; WULLSCHLEGER et al. 2006). Der mTORC1-Komplex besteht aus mTOR und dem Adaptorprotein Raptor (regulatory associated protein of mTOR) und reguliert durch die für diesen Proteinkomplex spezifische Effektor kinase p70 S6 Zellwachstum und Apoptose (BROWN et al. 1995; GINGRAS et al. 2001; WULLSCHLEGER et al. 2006). Im Gegensatz dazu besteht der mTORC2-Komplex aus mTOR und Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR). Dieser Proteinkomplex vermittelt zusätzliche Nebeneffekte wie beispielsweise die Organisation des Actinskelettes (LOEWITH et al. 2002). Interessanterweise ist nur der mTORC1-Proteinkomplex sensitiv für die pharmakologische Hemmung durch Rapamycin oder die Rapamycin-Analoga Sirolimus und Everolimus. mTORC2 wird nicht durch Rapamycin gehemmt (LOEWITH et al. 2002). In klinischen Studien kommt es durch Sirolimus-beschichtete Stents zur Verhinderung von intimaler Proliferation sowie zur Verringerung des Lumenverlustes in atherosklerotischen Koronargefäßen (MOSES et al. 2003; KASTRATI et al. 2005). Zusätzlich wird durch die mTORC1-Inhibitoren das Auftreten von intimaler Hyperplasie in kardialen Gefäßtransplantationen reduziert (EISEN et al. 2003). Diese positiven Auswirkungen

von Sirolimus auf die atherosklerotische Gefäßentwicklung wurde zuerst auf die direkte Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen zurückgeführt (MARX u. MARKS 2001). Zusätzlich werden in diesem Zusammenhang aber auch regulierende Effekte auf die Immunantwort diskutiert (DUMONT u. SU 1996). Darüber hinaus resultiert die pharmakologische Inhibierung des mTORC1-Komplexes durch Sirolimus und Everolimus sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Hemmung der Apoptose vaskulärer Zellen (HAY u. SONENBERG 2004; ZOHLNHÖFER et al. 2004; DANCEY 2006; NÜHRENBURG et al. 2007). Durch die mTORC1-Hemmung kommt es zur reduzierten Immunantwort und zur verminderten Rekrutierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen an die Stelle der Gefäßverletzung, wodurch die breite Wirkung von mTORC1 auf vaskuläre Reparatur- und Heilungsprozesse verdeutlicht wird (NÜHRENBURG et al. 2005; NÜHRENBURG et al. 2007). Ebenfalls wird eine Interaktion zwischen dem IFN- $\gamma$ -Signalweg und dem mTORC1-Proteinkomplex angenommen (Y. WANG et al. 2007). Die genauen Wechselwirkungen zwischen der Th1-Immunantwort und der mTOR-Aktivierung bleiben jedoch weiterhin offen.

### 4.3 Schlussfolgerungen und Ausblicke

Diese Studie zeigt, dass die CXCR3-Chemokine IP10 und MIG nicht nur die Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup>-Zellen an den Ort der Gefäßverletzung vermitteln, sondern ebenso eine zentrale Rolle bei der Aktivierung des mTORC1-Komplexes nach Endotheldenudation spielen. Durch die induzierte Gefäßverletzung kommt es zu einer grundlegenden Hochregulierung und Aktivierung der mTORC1-Kinase, was man deutlich an der signifikanten Phosphorylierung und damit Aktivierung der p70 S6 Kinase in den vaskulären Zellen nach Endotheldenudation beobachten kann. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse der *in vitro* Daten, dass die Stimulation des CXCR3-Signalweges zu einer vermehrten Generierung von Sauerstoffradikalen und einer erhöhten Induktion von Apoptose in Gefäßzellen führt. Da beide Effekte sensitiv für die mTORC1-Inhibitoren Sirolimus und Everolimus sind, liegt es nahe, dass es durch den CXCR3-Signalweg zu einer Aktivierung des mTORC1-Proteinkomplexes kommt. Dementsprechend findet sich in Gefäßzellen von CXCR3-defizienten Mäusen auch eine Reduktion der verletzungsbedingt initiierten Phosphorylierung der dem mTOR-Komplex nachgeschalteten p70 S6 Kinase. Dies deutet auf eine wichtige Rolle der CXCR3-Achse in der immun-vermittelten mTORC1-Aktivierung nach Gefäßverletzung hin. Hier können wir zeigen, dass die Interaktion zwischen der CXCR3-Aktivierung durch die beiden Liganden IP10 und MIG und der Aktivierung des mTORC1-Signalweges zur Generierung von oxidativem Stress und der Stimulation von Apoptose führt. Allerdings lassen die Ergebnisse der *in vitro* Daten bezüglich der IP10-induzierten Apoptose in Endothelzellen und Monozyten die Frage offen, auf welchem Weg die CXCR3-Achse die Apoptose von glatten Muskelzellen induziert. Dieser Effekt kann nicht direkt durch IP10 und MIG verursacht werden, da glatte Muskelzellen keinen CXCR3-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren (Abb. 21). Ebenso hat die IP10-Stimulation keinen Effekt auf glatte Muskelzellen (Abb. 39). Obwohl wir die verstärkte ROS-Generierung *in vivo* bisher nicht nachgewiesen haben, scheint es durch die CXCR3-vermittelte Apoptose in Monozyten und Endothelzellen, die durch die Freisetzung von ROS nach Gefäßverletzung begleitet wird, zu einer Aktivierung von mTORC1 in glatten Muskelzellen in der verletzten Gefäßwand zu kommen. So wurde vor kurzem durch Perez de Obamas et al. (PEREZ DE OBANOS et al. 2007) gezeigt, dass es durch ROS-Freisetzung zur Aktivierung von mTORC1 in Zellen kommt. Übereinstimmend mit diesen Daten führt



die Stimulation von CXCR3 in humanen immortalisierten proximalen Tubuluszellen zur ROS-Produktion durch das NADH/NADPH-Oxidationssystem (BEK et al. 2003). An dieser Stelle können wir jedoch nicht ausschließen, dass auch andere intrazelluläre Signalweg für die CXCR3-vermittelten Effekte nach Gefäßverletzung verantwortlich sind. Dafür sind weitere zukünftige Untersuchungen der verschiedenen involvierten Signalkaskaden, die die mTORC1- Aktivierung vermitteln, nötig.

Diese Daten sprechen für eine direkte Involvierung des mTORC1-Komplexes an CXCR3-vermittelten vaskulären pathologischen Reparatur- und Remodelingprozessen nach Gefäßverletzung. Es gibt sichere Anhaltspunkte, dass die CXCR3-Achse als Schnittstelle zwischen der Th1-Immunantwort, der mTORC1-Aktivierung, der vaskulären Inflammation und der Apoptose von Gefäßzellen bei kardiovaskulären Erkrankungen agiert. Aus diesem Grund stellen Therapieansätze, die auf eine selektive Blockade der CXCR3-Achse abzielen, vielversprechende Ansätze dar, um Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen zu helfen.

### 5. ZUSAMMENFASSUNG

Atherosklerose, Restenose und die nach einer Transplantation hervorgerufene Gefäßabstoßungsreaktion in Form von Atherosklerose sind alle durch die Ausbildung einer Intimahyperplasie charakterisiert. Ursachen dieser intimalen Hyperplasie ist die Zerstörung des Endothels, die Infiltration von mononukleären Leukozyten, die Rekrutierung von aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen und die Ansammlung von glatten Muskelzellen. Diese Vorgänge führen zu Remodeling- und Reparaturprozessen in dem verletzten Gefäß.

Die Th1 Immunantwort und hier vermutlich besonders die CXCR3-Chemokine IFN- $\gamma$  inducible protein 10 (IP10) und monokine induced by IFN- $\gamma$  (MIG) scheinen eine entscheidende Rolle bei den Remodeling- und Reparaturvorgängen in den verletzten Gefäßen zu spielen. Der genaue Mechanismus, der diesen Vorgängen zugrundeliegt, ist jedoch noch nicht völlig geklärt.

Durch genetische und pharmakologische Hemmung von CXCR3 kann in dieser Studie anhand des Gefäßverletzungsmodells bei der Maus nachgewiesen werden, dass die IP10/MIG/CXCR3-Achse eine entscheidende Rolle in der verletzungsinduzierten Aktivierung des mammalian Target of Rapamycin complex1 (mTORC1) spielt. mTORC1 ist eine essentielle und hochkonservierte Kinase, die auf der einen Seite für physiologische Effekte wie Proteinsynthese verantwortlich ist, auf der anderen Seite aber auch starken Einfluss auf die Inflammation, Apoptose, Reendothelialisierung und die Intimahyperplasie hat.

Durch eine drahtinduzierte Gefäßverletzung kommt es in den intimalen Zellen zu einer Aktivierung von mTORC1, was auch zu einer nachgeschalteten Induktion der p70 S6 Kinase führt. Sowohl die genetische Deletion von CXCR3, als auch die Neutralisierung der beiden Liganden IP10 und MIG mittels eines polyklonalen Antikörpercocktails heben die mTORC1-Aktivierung auf und führen zu einer verminderten Phosphorylierung der p70 S6 Kinase. Zudem kann durch Stimulationsversuche mit IP10 in der Zellkultur gezeigt werden, dass eine pharmakologische Hemmung des mTORC1 Komplexes durch Sirolimus und Everolimus zu einer Verminderung der Apoptose und eine geringeren Bildung von Sauerstoffradikalen in vaskulären Zellen führt. Dies stützt die Hypothese, dass CXCR3 direkt an der Aktivierung von mTORC1 in den Gefäßen beteiligt ist.

## **ZUSAMMENFASSUNG**

---

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die CXCR3-Achse eine entscheidende Rolle in der Aktivierung von mTORC1 spielt und das CXCR3-System deshalb eine wichtige Aufgabe in physiologischen und pathophysiologischen Remodeling- und Reparaturvorgängen nach der Gefäßverletzung innehat. Die Interaktion mit der CXCR3-Achse könnte eine neue therapeutische Option darstellen, um das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen zu minimieren.

**6 SUMMARY***Activation of the mTOR Kinase by the CXCR3 Chemokines IP10 and MIG Plays a Crucial Role in Cardiovascular Disease*

Atherosclerosis, restenosis and post-transplant graft atherosclerosis are characterized by intimal hyperplasia as a result of endothelial damage, infiltration of mononuclear leukocytes, recruitment of bone marrow-derived progenitor cells and accumulation of smooth muscle cells leading to remodeling and repair of injured arteries. The Th 1 immune response, especially the CXCR3 chemokines IFN- $\gamma$  inducible protein 10 (IP10) and monokine induced by IFN- $\gamma$  (MIG), have been implicated in vascular repair and remodeling; however, the molecular mechanisms affected hereby remain elusive.

Here, using genetic and pharmacological CXCR3 deletion in a mouse model of arterial injury we show for the first time that the IP10/MIG/CXCR3 axis is critical for injury-induced mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation governing subsequent inflammation, apoptosis, recruitment of progenitor cells, re-endothelialization and intimal hyperplasia.

On the level of intimal cells, wire injury induced profound activation of mTORC1 and its downstream target p70 S6 kinase in intimal cells. Unexpectedly, deletion of CXCR3 or neutralization of its ligands IP10 and MIG abolished mTORC1 activation and p70 S6 kinase phosphorylation in intimal cells. Moreover, IP10-induced apoptosis and generation of reactive oxygen species in vascular cells was abolished by pharmacologic mTORC1 inhibition further strengthening the hypothesis, that the CXCR3 axis directly activates vascular mTORC1.

These findings establish the CXCR3 chemokine axis as a major player in mTORC1 activation during vascular remodeling after arterial injury, a process, which is essential not only for vascular repair but also during pathological remodeling after vascular injury. Altogether, interfering with the CXCR3 axis may represent a novel therapeutic strategy to reduce cardiovascular disease.

### 7 LITERATURVERZEICHNIS

ABI-YOUNES, S., A. SAUTY, F. MACH, G. K. SUKHOVA, P. LIBBY u. A. D. LUSTER (2000):

The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques.

Circ Res 86, 131-138

ARAI, K., Z. X. LIU, T. LANE u. G. DENNERT (2002):

IP-10 and Mig facilitate accumulation of T cells in the virus-infected liver.

Cell Immunol 219, 48-56

ARJOMAND, H., Z. G. TURI, D. MCCORMICK u. S. GOLDBERG (2003):

Percutaneous coronary intervention: historical perspectives, current status, and future directions.

Am Heart J 146, 787-796

ARNOLD, R. S., J. SHI, E. MURAD, A. M. WHALEN, C. Q. SUN, R. POLAVARAPU, S. PARTHASARATHY, J. A. PETROS u. J. D. LAMBETH (2001):

Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1.

Proc Natl Acad Sci U S A 98, 5550-5555

ASSMANN, G., P. CULLEN, F. JOSSA, B. LEWIS u. M. MANCINI (1999):

Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 19, 1819-1824

BAGGIOLINI, M., B. DEWALD u. B. MOSER (1994):

Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines.

Adv Immunol 55, 97-179

BANFI, B., G. MOLNAR, A. MATURANA, K. STEGER, B. HEGEDUS, N.

DEMAUREX u. K. H. KRAUSE (2001):

A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes.

J Biol Chem 276, 37594-37601

BAZAN, J. F., K. B. BACON, G. HARDIMAN, W. WANG, K. SOO, D. ROSSI, D. R. GREAVES, A. ZLOTNIK u. T. J. SCHALL (1997):

A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif.

Nature 385, 640-644

BEK, M. J., H. C. REINHARDT, K. G. FISCHER, J. R. HIRSCH, C. HUPFER, E. DAYAL u. H. PAVENSTÄDT (2003):

Up-regulation of early growth response gene-1 via the CXCR3 receptor induces reactive oxygen species and inhibits Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in an immortalized human proximal tubule cell line.

J Immunol 170, 931-940

BELPERIO, J. A., M. P. KEANE, D. A. ARENBERG, C. L. ADDISON, J. E. EHLERT, M. D. BURDICK u. R. M. STRIETER (2000):

CXC chemokines in angiogenesis.

J Leukoc Biol 68, 1-8

BENTZON, J. F., C. S. SONDERGAARD, M. KASSEM u. E. FALK (2007):

Smooth muscle cells healing atherosclerotic plaque disruptions are of local, not blood, origin in apolipoprotein E knockout mice.

Circulation 116, 2053-2061

BEOHAR, N., J. D. FLAHERTY, C. J. DAVIDSON, R. C. MAYNARD, J. D. ROBBINS, A. P. SHAH, J. W. CHOI, L. A. MACDONALD, J. P. JORGENSEN, J. V. PINTO, S. CHANDRA, H. M. KLAUS, N. C. WANG, K. R. HARRIS, R. DECKER u. R. O. BONOW (2004):

Antirestenotic effects of a locally delivered caspase inhibitor in a balloon injury model.

Circulation 109, 108-113

BERETTA, L., A. C. GINGRAS, Y. V. SVITKIN, M. N. HALL u. N. SONENBERG (1996):

Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation.

Embo J 15, 658-664

BERGER, A. C., H. R. ALEXANDER, G. TANG, P. S. WU, S. M. HEWITT, E. TURNER, E. KRUGER, W. D. FIGG, A. GROVE, E. KOHN, D. STERN u. S. K. LIBUTTI (2000):

Endothelial monocyte activating polypeptide II induces endothelial cell apoptosis and may inhibit tumor angiogenesis.

Microvasc Res 60, 70-80

BODNAR, R. J., C. C. YATES u. A. WELLS (2006):

IP-10 blocks vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and tube formation via inhibition of calpain.

Circ Res 98, 617-625

BONECCHI, R., G. BIANCHI, P. P. BORDIGNON, D. D'AMBROSIO, R. LANG, A. BORSATTI, S. SOZZANI, P. ALLAVENA, P. A. GRAY, A. MANTOVANI u. F. SINIGAGLIA (1998):

Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s.

J Exp Med 187, 129-134

BORNFELDT, K. E., E. W. RAINES, T. NAKANO, L. M. GRAVES, E. G. KREBS u. R. ROSS (1994):

Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation.

J Clin Invest 93, 1266-1274

BRAUNWALD, E. (1997):

Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities.

N Engl J Med 337, 1360-1369

BROWN, E. J., P. A. BEAL, C. T. KEITH, J. CHEN, T. B. SHIN u. S. L. SCHREIBER (1995):

Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo.

Nature 377, 441-446

BRUNN, G. J., C. C. HUDSON, A. SEKULIC, J. M. WILLIAMS, H. HOSOI, P. J. HOUGHTON, J. C. LAWRENCE, JR. u. R. T. ABRAHAM (1997):

Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin.

Science 277, 99-101

BURNS, W. R., Y. WANG, P. C. TANG, H. RANJBARAN, A. IAKIMOV, J. KIM, M. CUFFY, Y. BAI, J. S. POBER u. G. TELLIDES (2005):

Recruitment of CXCR3+ and CCR5+ T cells and production of interferon-gamma-inducible chemokines in rejecting human arteries.

Am J Transplant 5, 1226-1236

CARMELIET, P. (2000):

Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.

Nat Med 6, 389-395

CARMELIET, P., L. MOONS u. D. COLLEN (1998):

Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis.

Cardiovasc Res 39, 8-33

CARMELIET, P., L. MOONS, J. M. STASSEN, M. DE MOL, A. BOUCHE, J. J. VAN DEN OORD, M. KOCKX u. D. COLLEN (1997):

Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice.

Am J Pathol 150, 761-776

CASTRO, C., J. M. CAMPISTOL, D. SANCHO, F. SANCHEZ-MADRID, E. CASALS u. V. ANDRES (2004):



Rapamycin attenuates atherosclerosis induced by dietary cholesterol in apolipoprotein-deficient mice through a p27 Kip1 -independent pathway. Atherosclerosis 172, 31-38

CLOWES, A. W., M. M. CLOWES, J. FINGERLE u. M. A. REIDY (1989): Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery. J Cardiovasc Pharmacol 14 Suppl 6, S12-15

CLOWES, A. W., M. A. REIDY u. M. M. CLOWES (1983): Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. Lab Invest 49, 327-333

COLLINS, R. G., R. VELJI, N. V. GUEVARA, M. J. HICKS, L. CHAN u. A. L. BEAUDET (2000): P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. J Exp Med 191, 189-194

DAEMEN, M. A., C. VAN 'T VEER, G. DENECKER, V. H. HEEMSKERK, T. G. WOLFS, M. CLAUSS, P. VANDENABEELE u. W. A. BUURMAN (1999): Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. J Clin Invest 104, 541-549

DAHME, E. u. B. SCHRÖDER (1990): Allgemeine Stoffwechselstörungen: Atherosklerose - Arteriosklerose. In: Kitt H. (Hrsg.). Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie 10. Auflage, Enke, 191-193

DANCEY, J. E. (2006): Therapeutic targets: MTOR and related pathways. Cancer Biol Ther 5, 1065-1073

DANENBERG, H. D., I. FISHBEIN, J. GAO, J. MONKKONEN, R. REICH, I. GATI, E. MOERMAN u. G. GOLOMB (2002):

Macrophage depletion by clodronate-containing liposomes reduces neointimal formation after balloon injury in rats and rabbits.

Circulation 106, 599-605

DIMMELER, S. u. A. M. ZEHER (2004):

Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis?

J Mol Med 82, 671-677

DOGGRELL, S. A. u. L. BROWN (1998):

Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure.

Cardiovasc Res 39, 89-105

DONG, Z. M., S. M. CHAPMAN, A. A. BROWN, P. S. FRENETTE, R. O. HYNES u. D. D. WAGNER (1998):

The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis.

J Clin Invest 102, 145-152

DROGE, W. (2002):

Free radicals in the physiological control of cell function.

Physiol Rev 82, 47-95

DUMONT, F. J. u. Q. SU (1996):

Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin.

Life Sci 58, 373-395

DUNDAR, Y., R. A. HILL, A. BAKHAI, R. DICKSON u. T. WALLEY (2004):

Angioplasty and stents in coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis.

Scand Cardiovasc J 38, 200-210

EISEN, H. J., E. M. TUZCU, R. DORENT, J. KOBASHIGAWA, D. MANCINI, H. A. VALANTINE-VON KAEPLER, R. C. STARLING, K. SORENSEN, M. HUMMEL, J. M. LIND, K. H. ABEYWICKRAMA u. P. BERNHARDT (2003):

Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients.

N Engl J Med 349, 847-858

FARB, A., G. SANGIORGI, A. J. CARTER, V. M. WALLEY, W. D. EDWARDS, R. S. SCHWARTZ u. R. VIRMANI (1999):

Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans.

Circulation 99, 44-52

FARB, A., D. K. WEBER, F. D. KOLODGIE, A. P. BURKE u. R. VIRMANI (2002):

Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans.

Circulation 105, 2974-2980

FINGAR, D. C., S. SALAMA, C. TSOU, E. HARLOW u. J. BLENIS (2002):

Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E.

Genes Dev 16, 1472-1487

FINKEL, T. (2003):

Oxidant signals and oxidative stress.

Curr Opin Cell Biol 15, 247-254

FINKING, G. u. H. HANKE (1997):

Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research.

Atherosclerosis 135, 1-7

FISCHMAN, D. L., M. B. LEON, D. S. BAIM, R. A. SCHATZ, M. P. SAVAGE, I.

PENN, K. DETRE, L. VELTRI, D. RICCI, M. NOBUYOSHI u. ET AL. (1994):

A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators.

N Engl J Med 331, 496-501

FUSTER, V., M. POON u. J. T. WILLERSON (1998):

Learning from the transgenic mouse: endothelium, adhesive molecules, and neointimal formation.

Circulation 97, 16-18

GALLO, R., A. PADUREAN, T. JAYARAMAN, S. MARX, M. ROQUE, S. ADELMAN, J. CHESEBRO, J. FALLON, V. FUSTER, A. MARKS u. J. J. BADIMON (1999):

Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle.

Circulation 99, 2164-2170

GASPERINI, S., M. MARCHI, F. CALZETTI, C. LAUDANNA, L. VICENTINI, H.

OLSEN, M. MURPHY, F. LIAO, J. FARBER u. M. A. CASSATELLA (1999):

Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils.

J Immunol 162, 4928-4937

GENESER, F. (1990):

Aufbau der Blutgefäße, In: GENESER, F. u. W. SCHWERDTFEGGER (Hrsg.).

Histologie Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 317-331

GIMBRONE, M. A., JR. (1999):

Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis.

Am J Pathol 155, 1-5

GINGRAS, A. C., B. RAUGHT u. N. SONENBERG (2001):

Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR.

Genes Dev 15, 807-826

GODESSART, N. (2005):

Chemokine receptors: attractive targets for drug discovery.

Ann N Y Acad Sci 1051, 647-657

GRAVES, L. M., K. E. BORNFELDT, G. M. ARGAST, E. G. KREBS, X. KONG, T. A. LIN u. J. C. LAWRENCE, JR. (1995):

cAMP- and rapamycin-sensitive regulation of the association of eukaryotic initiation factor 4E and the translational regulator PHAS-I in aortic smooth muscle cells.

Proc Natl Acad Sci U S A 92, 7222-7226

GRIENDLING, K. K. u. G. A. FITZGERALD (2003):

Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies.

Circulation 108, 2034-2040

GRIENDLING, K. K., D. SORESCU u. M. USHIO-FUKAI (2000):

NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease.

Circ Res 86, 494-501

GRUNTZIG, A. R., A. SENNING u. W. E. SIEGENTHALER (1979):

Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty.

N Engl J Med 301, 61-68

GUPTA, S., A. M. PABLO, X. JIANG, N. WANG, A. R. TALL u. C. SCHINDLER (1997):

IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice.

J Clin Invest 99, 2752-2761

HABERMEHL, K. H. (1966):

[Morphology and function of the specific blood vessels of the heart].

Zentralbl Veterinarmed A 13, 111-138

HANCOCK, W. W., B. LU, W. GAO, V. CSIZMADIA, K. FAIA, J. A. KING, S. T. SMILEY, M. LING, N. P. GERARD u. C. GERARD (2000):

Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection.

J Exp Med 192, 1515-1520

HARKNESS, M. L., R. D. HARKNESS u. D. D. MC (1955):

The collagen and elastin content of the arterial wall.

J Physiol 127, 33-34P

HARMON, K. J., L. L. COUPER u. V. LINDNER (2000):

Strain-dependent vascular remodeling phenotypes in inbred mice.

Am J Pathol 156, 1741-1748

HAUNSTETTER, A. u. S. IZUMO (1998):

Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease.

Circ Res 82, 1111-1129

HAY, N. u. N. SONENBERG (2004):

Upstream and downstream of mTOR.

Genes Dev 18, 1926-1945

HENSON, P. M., D. L. BRATTON u. V. A. FADOK (2001):

Apoptotic cell removal.

Curr Biol 11, R795-805

HILLYER, P., E. MORDELET, G. FLYNN u. D. MALE (2003):

Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect leucocyte migration.

Clin Exp Immunol 134, 431-441

JEFFERIES, H. B., S. FUMAGALLI, P. B. DENNIS, C. REINHARD, R. B. PEARSON u. G. THOMAS (1997):

Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k.

Embo J 16, 3693-3704

JINQUAN, T., L. ANTING, H. H. JACOBI, C. GLUE, C. JING, L. P. RYDER, H. O.

MADSEN, A. SVEJGAARD, P. S. SKOV, H. J. MALLING u. L. K. POULSEN (2001):

CXCR3 expression on CD34(+) hemopoietic progenitors induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: II. Signaling pathways involved.

J Immunol 167, 4405-4413

JOHNSON, D. G., K. OHTANI u. J. R. NEVINS (1994):

Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression.

Genes Dev 8, 1514-1525

KAKITA, C., P. J. JOHNSON, R. PICK u. L. N. KATZ (1972):

Relationship between plasma cholesterol level and coronary atherosclerosis in cholesterol-oil fed cockerels.

Atherosclerosis 15, 17-29

KANTOR, B., K. ASHAI, D. R. HOLMES, JR. u. R. S. SCHWARTZ (1999):

The experimental animal models for assessing treatment of restenosis.

Cardiovasc Radiat Med 1, 48-54

KAO, J., Y. G. FAN, I. HAEHNEL, J. BRETT, S. GREENBERG, M. CLAUSS, M.

KAYTON, K. HOUCK, W. KISIEL, R. SELJELID u. ET AL. (1994):

A peptide derived from the amino terminus of endothelial-monocyte-activating polypeptide II modulates mononuclear and polymorphonuclear leukocyte functions, defines an apparently novel cellular interaction site, and induces an acute inflammatory response.

J Biol Chem 269, 9774-9782

KAO, J., J. RYAN, G. BRETT, J. CHEN, H. SHEN, Y. G. FAN, G. GODMAN, P. C.

FAMILLETTI, F. WANG, Y. C. PAN u. ET AL. (1992):

Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms.

J Biol Chem 267, 20239-20247

KASTRATI, A., A. DIBRA, S. EBERLE, J. MEHILLI, J. SUAREZ DE LEZO, J. J.

GOY, K. ULM u. A. SCHÖMIG (2005):

Sirolimus-eluting stents vs paclitaxel-eluting stents in patients with coronary artery disease: meta-analysis of randomized trials.

Jama 294, 819-825

KAWAMURA, A., S. MIURA, M. FUJINO, H. NISHIKAWA, Y. MATSUO, H. TANIGAWA, S. TOMITA, Y. TSUCHIYA, K. MATSUO u. K. SAKU (2003): CXCR3 chemokine receptor-plasma IP10 interaction in patients with coronary artery disease.

Circ J 67, 851-854

KELNER, G. S., J. KENNEDY, K. B. BACON, S. KLEYENSTEUBER, D. A. LARGAESPADA, N. A. JENKINS, N. G. COPELAND, J. F. BAZAN, K. W. MOORE, T. J. SCHALL u. ET AL. (1994):

Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine.

Science 266, 1395-1399

KERR, J. F., A. H. WYLLIE u. A. R. CURRIE (1972):

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

Br J Cancer 26, 239-257

KNIES, U. E., H. A. BEHRENSDORF, C. A. MITCHELL, U. DEUTSCH, W. RISAU, H. C. DREXLER u. M. CLAUSS (1998):

Regulation of endothelial monocyte-activating polypeptide II release by apoptosis.

Proc Natl Acad Sci U S A 95, 12322-12327

KOCKX, M. M. u. A. G. HERMAN (2000):

Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental?

Cardiovasc Res 45, 736-746

KOMATSU, R., M. UEDA, T. NARUKO, A. KOJIMA u. A. E. BECKER (1998):

Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses.

Circulation 98, 224-233



KORNOWSKI, R., M. K. HONG, F. O. TIO, O. BRAMWELL, H. WU u. M. B. LEON (1998):

In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia.

J Am Coll Cardiol 31, 224-230

KUCIA, M., K. JANKOWSKI, R. RECA, M. WYSOCZYNSKI, L. BANDURA, D. J. ALLENDORF, J. ZHANG, J. RATAJCZAK u. M. Z. RATAJCZAK (2004):

CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion.

J Mol Histol 35, 233-245

KUHEL, D. G., B. ZHU, D. P. WITTE u. D. Y. HUI (2002):

Distinction in genetic determinants for injury-induced neointimal hyperplasia and diet-induced atherosclerosis in inbred mice.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 22, 955-960

KUMAR, A. u. V. LINDNER (1997):

Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 17, 2238-2244

KUNTZE, A. (1995):

Schweine – Herz, Kreislaufsystem. In: Göldenboth R., Klös H.-G.,.

Krankheiten der Zoo- und Wildtiere Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin, 240

LAMBETH, J. D. (2004):

NOX enzymes and the biology of reactive oxygen.

Nat Rev Immunol 4, 181-189

LE, Y., Y. ZHOU, P. IRIBARREN u. J. WANG (2004):

Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease.

Cell Mol Immunol 1, 95-104

LEE, S. R., K. S. KWON, S. R. KIM u. S. G. RHEE (1998):

Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor.

J Biol Chem 273, 15366-15372

LEGARE, J. F., T. ISSEKUTZ, T. D. LEE u. G. HIRSCH (2000):

CD8+ T lymphocytes mediate destruction of the vascular media in a model of chronic rejection.

Am J Pathol 157, 859-865

LEON, M. L. u. S. H. ZUCKERMAN (2005):

Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis.

Inflamm Res 54, 395-411

LI, P. F., R. DIETZ u. R. VON HARSDORF (1997):

Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell.

FEBS Lett 404, 249-252

LOETSCHER, M., B. GERBER, P. LOETSCHER, S. A. JONES, L. PIALI, I. CLARK-LEWIS, M. BAGGIOLINI u. B. MOSER (1996):

Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes.

J Exp Med 184, 963-969

LOEWITH, R., E. JACINTO, S. WULLSCHLEGER, A. LORBERG, J. L. CRESPO, D. BONENFANT, W. OPPLIGER, P. JENOE u. M. N. HALL (2002):

Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control.

Mol Cell 10, 457-468

LUSCHER, T. F., J. STEFFEL, F. R. EBERLI, M. JONER, G. NAKAZAWA, F. C. TANNER u. R. VIRMANI (2007):

Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications.

Circulation 115, 1051-1058

LUSTER, A. D. (1998):

Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation.

N Engl J Med 338, 436-445

LUSTER, A. D., S. M. GREENBERG u. P. LEDER (1995):

The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation.

J Exp Med 182, 219-231

LUSTER, A. D. u. P. LEDER (1993):

IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo.

J Exp Med 178, 1057-1065

MACH, F., A. SAUTY, A. S. IAROSI, G. K. SUKHOVA, K. NEOTE, P. LIBBY u. A. D. LUSTER (1999):

Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells.

J Clin Invest 104, 1041-1050

MACH, F., U. SCHONBECK, G. K. SUKHOVA, E. ATKINSON u. P. LIBBY (1998):

Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling.

Nature 394, 200-203

MADAMANCHI, N. R. u. M. S. RUNGE (2007):

Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis.

Circ Res 100, 460-473

MARX, S. O. u. A. R. MARKS (2001):

Bench to bedside: the development of rapamycin and its application to stent restenosis.

Circulation 104, 852-855

MASSBERG, S., I. KONRAD, K. SCHÜRZINGER, M. LORENZ, S. SCHNEIDER, D. ZOHLNHÖFER, K. HOPPE, M. SCHIEMANN, E. KENNERKNECHT, S. SAUER, C. SCHULZ, S. KERSTAN, M. RUDELIUS, S. SEIDL, F. SORGE, H. LANGER, M. PELUSO, P. GOYAL, D. VESTWEBER, N. R. EMAMBOKUS, D. H. BUSCH, J. FRAMPTON u. M. GAWAZ (2006):

Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo.

J Exp Med 203, 1221-1233

MINTZ, G. S., J. J. POPMA, M. K. HONG, A. D. PICHARD, K. M. KENT, L. F. SATLER u. M. B. LEON (1996):

Intravascular ultrasound to discern device-specific effects and mechanisms of restenosis.

Am J Cardiol 78, 18-22

MOSES, J. W., M. B. LEON, J. J. POPMA, P. J. FITZGERALD, D. R. HOLMES, C. O'SHAUGHNESSY, R. P. CAPUTO, D. J. KEREIAKES, D. O. WILLIAMS, P. S. TEIRSTEIN, J. L. JAEGER u. R. E. KUNTZ (2003):

Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery.

N Engl J Med 349, 1315-1323

MOSES, J. W., G. W. STONE, E. NIKOLSKY, G. S. MINTZ, G. DANGAS, E. GRUBE, S. G. ELLIS, A. J. LANSKY, G. WEISZ, M. FAHY, Y. NA, M. E. RUSSELL, D. DONOHOE, M. B. LEON u. R. MEHRAN (2006):

Drug-eluting stents in the treatment of intermediate lesions: pooled analysis from four randomized trials.

J Am Coll Cardiol 47, 2164-2171

MULLER, D. W., S. G. ELLIS u. E. J. TOPOL (1992):

Experimental models of coronary artery restenosis.

J Am Coll Cardiol 19, 418-432

NÜHRENBERG, T. G., N. LANGWIESER, J. B. SCHWARZ, Y. HOU, P. FRANK, F. SORGE, S. MATSCHURAT, S. SEIDL, A. SCHÖMIG, M. A. CLAUSS u. D. ZOHLNHÖFER (2007):

EMAP-II downregulation contributes to the beneficial effects of Rapamycin after vascular injury.

Cardiovasc Res in press,

NÜHRENBERG, T. G., R. VOISARD, F. FAHLISCH, M. RUDELIUS, J. BRAUN, J. GSCHWEND, M. KOUNTIDES, T. HERTER, R. BAUR, V. HOMBACH, P. A. BAEUERLE u. D. ZOHLNHÖFER (2005):

Rapamycin attenuates vascular wall inflammation and progenitor cell promoters after angioplasty.

Faseb J 19, 246-248

OKAMOTO, Y., E. J. FOLCO, M. MINAMI, A. K. WARA, M. W. FEINBERG, G. K. SUKHOVA, R. A. COLVIN, S. KIHARA, T. FUNAHASHI, A. D. LUSTER u. P. LIBBY (2007):

Adiponectin Inhibits the Production of CXC Receptor Chemokine Ligands in Macrophages and Reduces T-Lymphocyte Recruitment in Atherogenesis.

Circ Res in press,

PEREZ DE OBANOS, M. P., M. J. LOPEZ-ZABALZA, E. ARRIAZU, T. MODOL, J. PRIETO, M. T. HERRAIZ u. M. J. IRABURU (2007):

Reactive oxygen species (ROS) mediate the effects of leucine on translation regulation and type I collagen production in hepatic stellate cells.

Biochim Biophys Acta 1773, 1681-1688

PFAFFL, M. W. (2001):

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.

Nucleic Acids Res 29, e45

PIALI, L., C. WEBER, G. LAROSA, C. R. MACKAY, T. A. SPRINGER, I. CLARK-LEWIS u. B. MOSER (1998):

The chemokine receptor CXCR3 mediates rapid and shear-resistant adhesion-induction of effector T lymphocytes by the chemokines IP10 and Mig.

Eur J Immunol 28, 961-972

PIPER, K. P., C. HORLOCK, S. J. CURNOW, J. ARRAZI, S. NICHOLLS, P. MAHENDRA, C. CRADDOCK u. P. A. MOSS (2007):

CXCL10-CXCR3 interactions play an important role in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease in the skin following allogeneic stem-cell transplantation.

Blood 110, 3827-3832

PLUMP, A. S., J. D. SMITH, T. HAYEK, K. AALTO-SETALA, A. WALSH, J. G. VERSTUYFT, E. M. RUBIN u. J. L. BRESLOW (1992):

Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells.

Cell 71, 343-353

POON, M., J. J. BADIMON u. V. FUSTER (2002):

Overcoming restenosis with sirolimus: from alphabet soup to clinical reality.

Lancet 359, 619-622

POON, M., S. O. MARX, R. GALLO, J. J. BADIMON, M. B. TAUBMAN u. A. R. MARKS (1996):

Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration.

J Clin Invest 98, 2277-2283

RANJBARAN, H., S. I. SOKOL, A. GALLO, R. E. EID, A. O. IAKIMOV, A.

D'ALESSIO, J. R. KAPOOR, S. AKHTAR, C. J. HOWES, M. ASLAN, S. PFAU, J. S.

POBER u. G. TELLIDES (2007):

An inflammatory pathway of IFN-gamma production in coronary atherosclerosis.

J Immunol 178, 592-604

REISER, R., M. F. SORRELS u. M. C. WILLIAMS (1959):

Influence of high levels of dietary fats and cholesterol on atherosclerosis and lipid distribution in swine.

Circ Res 7, 833-846

ROBINSON, J. P., L. H. BRUNER, C. F. BASSOE, J. L. HUDSON, P. A. WARD u. S. H. PHAN (1988):

Measurement of intracellular fluorescence of human monocytes relative to oxidative metabolism.

J Leukoc Biol 43, 304-310

ROGERS, C., E. R. EDELMAN u. D. I. SIMON (1998):

A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits.

Proc Natl Acad Sci U S A 95, 10134-10139

ROGERS, C., F. G. WELT, M. J. KARNOVSKY u. E. R. EDELMAN (1996):

Monocyte recruitment and neointimal hyperplasia in rabbits. Coupled inhibitory effects of heparin.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 16, 1312-1318

ROMAGNANI, P., F. ANNUNZIATO, L. LASAGNI, E. LAZZERI, C. BELTRAME, M. FRANCALANCI, M. UGUCCIONI, G. GALLI, L. COSMI, L. MAURENZIG, M.

BAGGIOLINI, E. MAGGI, S. ROMAGNANI u. M. SERIO (2001):

Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity.

J Clin Invest 107, 53-63

ROQUE, M., J. T. FALLON, J. J. BADIMON, W. X. ZHANG, M. B. TAUBMAN u. E. D. REIS (2000):

Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 20, 335-342

ROSS, R. (1999):

Atherosclerosis--an inflammatory disease.

N Engl J Med 340, 115-126

SATA, M., Y. MAEJIMA, F. ADACHI, K. FUKINO, A. SAIURA, S. SUGIURA, T. AOYAGI, Y. IMAI, H. KURIHARA, K. KIMURA, M. OMATA, M. MAKUUCHI, Y. HIRATA u. R. NAGAI (2000):

A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia.

J Mol Cell Cardiol. 32, 2097-2104

SATA, M., A. SAIURA, A. KUNISATO, A. TOJO, S. OKADA, T. TOKUHIRA, H. HIRAI, M. MAKUUCHI, Y. HIRATA u. R. NAGAI (2002):

Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis.

Nat Med 8, 403-409

SAXENA, A., J. D. MCMEEKIN u. D. J. THOMSON (2002):

Expression of Bcl-x, Bcl-2, Bax, and Bak in endarterectomy and atherectomy specimens.

J Pathol 196, 335-342

SCHOBBER, A., S. KNARREN, M. LIETZ, E. A. LIN u. C. WEBER (2003):

Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice.

Circulation 108, 2491-2497

SCHWARTZ, R. S. (1998):

Pathophysiology of restenosis: interaction of thrombosis, hyperplasia, and/or remodeling.

Am J Cardiol 81, 14E-17E

SCHWARTZ, S. M. (1997):

Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis.

J Clin Invest 100, S87-89



SCHWARZ, M. A., J. KANDEL, J. BRETT, J. LI, J. HAYWARD, R. E. SCHWARZ, O. CHAPPEY, J. L. WAUTIER, J. CHABOT, P. LO GERFO u. D. STERN (1999):  
Endothelial-monocyte activating polypeptide II, a novel antitumor cytokine that suppresses primary and metastatic tumor growth and induces apoptosis in growing endothelial cells.

J Exp Med 190, 341-354

SEHGAL, S. N. (2003):

Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action.

Transplant Proc 35, 7S-14S

SEHGAL, S. N., H. BAKER u. C. VEZINA (1975):

Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization.

J Antibiot (Tokyo) 28, 727-732

SERRUYS, P. W., P. DE JAEGERE, F. KIEMENEIJ, C. MACAYA, W. RUTSCH, G. HEYNDRIKX, H. EMANUELSSON, J. MARCO, V. LEGRAND, P. MATERNE u. ET AL. (1994):

A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group.

N Engl J Med 331, 489-495

SHIOSE, A., J. KURODA, K. TSURUYA, M. HIRAI, H. HIRAKATA, S. NAITO, M. HATTORI, Y. SAKAKI u. H. SUMIMOTO (2001):

A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney.

J Biol Chem 276, 1417-1423

SMYTH, S. S., E. D. REIS, W. ZHANG, J. T. FALLON, R. E. GORDON u. B. S. COLLIER (2001):

Beta(3)-integrin-deficient mice but not P-selectin-deficient mice develop intimal hyperplasia after vascular injury: correlation with leukocyte recruitment to adherent platelets 1 hour after injury.

Circulation 103, 2501-2507

SOUSA, J. E., M. A. COSTA, A. C. ABIZAID, B. J. RENSING, A. S. ABIZAID, L. F. TANAJURA, K. KOZUMA, G. VAN LANGENHOVE, A. G. SOUSA, R. FALOTICO, J. JAEGER, J. J. POPMA u. P. W. SERRUYS (2001):

Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up.

Circulation 104, 2007-2011

STRIETER, R. M., M. D. BURDICK, B. N. GOMPERTS, J. A. BELPERIO u. M. P. KEANE (2005):

CXC chemokines in angiogenesis.

Cytokine Growth Factor Rev 16, 593-609

STRIETER, R. M., P. J. POLVERINI, S. L. KUNKEL, D. A. ARENBERG, M. D.

BURDICK, J. KASPER, J. DZUIBA, J. VAN DAMME, A. WALZ, D. MARRIOTT u. ET AL. (1995):

The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis.

J Biol Chem 270, 27348-27357

SUZUKI, K., Y. KAWAUCHI, S. S. PALANIYANDI, P. T. VEERAVEEDU, M. FUJII, S. YAMAGIWA, H. YONEYAMA, G. D. HAN, H. KAWACHI, Y. OKADA, Y. AJIOKA, K. WATANABE, M. HOSONO, H. ASAKURA, Y. AOYAGI u. S. NARUMI (2007):

Blockade of interferon-gamma-inducible protein-10 attenuates chronic experimental colitis by blocking cellular trafficking and protecting intestinal epithelial cells.

Pathol Int 57, 413-420

TELLIDES, G. u. J. S. POBER (2007):

Interferon-gamma axis in graft arteriosclerosis.

Circ Res 100, 622-632

TELLIDES, G., D. A. TEREH, N. C. KIRKILES-SMITH, R. W. KIM, J. H. WILSON, J. S. SCHECHNER, M. I. LORBER u. J. S. POBER (2000):

Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes.

Nature 403, 207-211

VAN VLEET, J. F. u. V. J. FERRANS (1995):

Pathology of the cardiovascular system. In: Carlton W.W., McGavin M.D. (Hrsg.).  
Thomson's Special Veterinary Pathology 2. Auflage, Mosby, St.Louis, Baltimore.,  
175-180, 198-203

VAN WANROOIJ, E. J., S. C. DE JAGER, T. VAN ES, P. DE VOS, H. L. BIRCH, D.  
A. OWEN, R. J. WATSON, E. A. BIESSEN, G. A. CHAPMAN, T. J. VAN BERKEL u.  
J. KUIPER (2008):

CXCR3 antagonist NBI-74330 attenuates atherosclerotic plaque formation in LDL  
receptor-deficient mice.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 28, 251-257

VEILLARD, N. R., S. STEFFENS, G. PELLI, B. LU, B. R. KWAK, C. GERARD, I. F.  
CHARO u. F. MACH (2005):

Differential influence of chemokine receptors CCR2 and CXCR3 in development of  
atherosclerosis in vivo.

Circulation 112, 870-878

VEZINA, C., A. KUDELSKI u. S. N. SEHGAL (1975):

Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing  
streptomycete and isolation of the active principle.

J Antibiot (Tokyo) 28, 721-726

VIRMANI, R. u. A. FARB (1999):

Pathology of in-stent restenosis.

Curr Opin Lipidol 10, 499-506

VIRMANI, R., A. FARB, G. GUAGLIUMI u. F. D. KOLODIE (2004):

Drug-eluting stents: caution and concerns for long-term outcome.

Coron Artery Dis 15, 313-318

WALTER, D. H., K. RITTIG, F. H. BAHLMANN, R. KIRCHMAIR, M. SILVER, T. MURAYAMA, H. NISHIMURA, D. W. LOSORDO, T. ASAHARA u. J. M. ISNER (2002):

Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells.

Circulation 105, 3017-3024

WANG, X. u. C. G. PROUD (2006):

The mTOR pathway in the control of protein synthesis.

Physiology (Bethesda) 21, 362-369

WANG, Y., Y. BAI, L. QIN, P. ZHANG, T. YI, S. A. TEESDALE, L. ZHAO, J. S. POBER u. G. TELLIDES (2007):

Interferon-gamma induces human vascular smooth muscle cell proliferation and intimal expansion by phosphatidylinositol 3-kinase dependent mammalian target of rapamycin raptor complex 1 activation.

Circ Res 101, 560-569

WEBER, C. (2007):

Chemokines take centre stage in vascular biology.

Thromb Haemost 97, 685-687

WERNER, N., S. JUNK, U. LAUFS, A. LINK, K. WALENTA, M. BOHM u. G. NICKENIG (2003):

Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury.

Circ Res 93, e17-24

WERNER, N., J. PRILLER, U. LAUFS, M. ENDRES, M. BOHM, U. DIRNAGL u. G. NICKENIG (2002):

Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 22, 1567-1572

WULLSCHLEGER, S., R. LOEWITH u. M. N. HALL (2006):

TOR signaling in growth and metabolism.

Cell 124, 471-484

XIE, J. H., N. NOMURA, M. LU, S. L. CHEN, G. E. KOCH, Y. WENG, R. ROSA, J. DI SALVO, J. MUDGETT, L. B. PETERSON, L. S. WICKER u. J. A. DEMARTINO (2003):

Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation.

J Leukoc Biol 73, 771-780

YASUKAWA, H., T. IMAIZUMI, H. MATSUOKA, A. NAKASHIMA u. M. MORIMATSU (1997):

Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury by antibodies to intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1.

Circulation 95, 1515-1522

YOKOTE, K., A. TAKE, C. NAKASEKO, K. KOBAYASHI, M. FUJIMOTO, H. KAWAMURA, Y. MAEZAWA, M. NISHIMURA, S. MORI u. Y. SAITO (2003):

Bone marrow-derived vascular cells in response to injury.

J Atheroscler Thromb 10, 205-210

ZAMPETAKI, A., Z. ZHANG, Y. HU u. Q. XU (2005):

Biomechanical stress induces IL-6 expression in smooth muscle cells via Ras/Rac1-p38 MAPK-NF-kappaB signaling pathways.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 288, H2946-2954

ZEIFFER, U., A. SCHOBER, M. LIETZ, E. A. LIEHN, W. ERL, N. EMANS, Z. Q. YAN u. C. WEBER (2004):

Neointimal smooth muscle cells display a proinflammatory phenotype resulting in increased leukocyte recruitment mediated by P-selectin and chemokines.

Circ Res 94, 776-784

ZERNECKE, A., A. SCHOBER, I. BOT, P. VON HUNDELSHAUSEN, E. A. LIEHN, B. MOPPS, M. MERICKSKAY, P. GIERSECHIK, E. A. BIESSEN u. C. WEBER (2005):  
SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells.

Circ Res 96, 784-791

ZHANG, H. M., J. YUAN, P. CHEUNG, D. CHAU, B. W. WONG, B. M. MCMANUS u. D. YANG (2005):

Gamma interferon-inducible protein 10 induces HeLa cell apoptosis through a p53-dependent pathway initiated by suppression of human papillomavirus type 18 E6 and E7 expression.

Mol Cell Biol 25, 6247-6258

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W., E. THIEL, A. FUTTERER, V. HERZOG, A. WIRTZ u. G. RIETHMULLER (1988):

Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes.

Int J Cancer 41, 456-461

ZOHLNHÖFER, D., C. A. KLEIN, T. RICHTER, R. BRANDL, A. MURR, T.

NÜHRENBURG, A. SCHÖMIG, P. A. BAEUERLE u. F. J. NEUMANN (2001a):

Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy: Detection of FK506-binding protein 12 upregulation.

Circulation 103, 1396-1402

ZOHLNHÖFER, D., T. G. NÜHRENBURG, F. J. NEUMANN, T. RICHTER, A. E.

MAY, R. SCHMIDT, K. DENKER, M. A. CLAUS, A. SCHÖMIG u. P. A. BAEUERLE (2004):

Rapamycin effects transcriptional programs in smooth muscle cells controlling proliferative and inflammatory properties.

Mol Pharmacol 65, 880-889

ZOHLNHÖFER, D., T. RICHTER, F. NEUMANN, T. NÜHRENBURG, R. WESSELY,  
R. BRANDL, A. MURR, C. A. KLEIN u. P. A. BAEUERLE (2001b):

Transcriptome analysis reveals a role of interferon-gamma in human neointima  
formation.

Mol Cell 7, 1059-1069

### 8      TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Peptidsequenzen von IP10 und MIG
Tabelle 2:	Versuchsplan und Gruppeneinteilung
Tabelle 3:	Morphometrisch erhobene Parameter
Tabelle 4:	Berechnete Parameter
Tabelle 5:	Primärantikörper LSAB-Methode
Tabelle 6:	Primärantikörper Apaap-Methode
Tabelle 7:	Primärantikörper Immunfluoreszenz
Tabelle 8:	Fluorchromkonjugierte Zweitantikörper
Tabelle 9:	Primärantikörper Doppelimmunfluoreszenz
Tabelle 10:	Housekeeping-Gene
Tabelle 11:	Ansatz Taq-Polymerase
Tabelle 12:	Primer real-time RT-PCR
Tabelle 13:	Temperaturschritte real-time RT-PCR
Tabelle 14:	Kulturflaschen und Medien für HCSCs und HUVECs
Tabelle 15:	Kultuflaschen und Medium für MonoMac6



**9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1:	Aufbau einer Arterie muskulären Bautyps
Abbildung 2:	Atherosklerose – eine inflammatorische Erkrankung
Abbildung 3:	Struktur von verschiedenen Chemokinen
Abbildung 4:	Aktivierung der CXCR3-IP10-MIG-Achse
Abbildung 5:	Strukturformel von Rapamycin
Abbildung 6:	Koordinierung von Zellzyklus und Zellwachstum durch mTOR
Abbildung 7:	Darstellung des tierexperimentellen Ablaufs der Studie
Abbildung 8:	Genstrategie der CXCR3-Knockout-Maus
Abbildung 9:	Operationsvorbereitung und Lagerung
Abbildung 10:	A. et V. Femoralis (a) und Guide Wire (b)
Abbildung 11:	In Vivo Darstellung des Operationsablauf
Abbildung 12:	Schematische Darstellung des Femoralisverletzungsmodell
Abbildung 13:	Schematische Darstellung der histomorphometrischen Auswertung
Abbildung 14:	Morphometrische Auswertung
Abbildung 15:	Schematischer Ablauf der cDNA-Synthese
Abbildung 16:	Schematische Darstellungen der Thermalen Cycler Bedingungen
Abbildung 17:	Schematische Darstellung ELISA
Abbildung 18:	Quantitative real-time RT-PCR für IP10, MIG und CXCR3
Abbildung 19:	Serumproteinkonzentration von IP10 und MIG nach Gefäßverletzung
Abbildung 20:	Immunhistochemische Färbung für CXCR3
Abbildung 21:	Doppelimmunfluoreszenz für CXCR3
Abbildung 22:	Quantifizierung von CXCR3 <sup>+</sup> -Zellen
Abbildung 23:	Statistische Quantifizierung und Charakterisierung des prozentualen Anteils CXCR3 <sup>+</sup> -Zellen
Abbildung 24:	Morphometrische Auswertung CXCR3 <sup>-/-</sup> - und WT-Mäuse
Abbildung 25:	Morphometrische Auswertung antikörper- bzw. placebobehandelter Mäuse
Abbildung 26:	Immunhistochemische Analyse der Intimahyperplasie in WT- und CXCR3 <sup>-/-</sup> Mäuse

Abbildung 27:	Korrelation zwischen Intimahyperplasie und Rekrutierung von CD3 <sup>+</sup> -Zellen in WT- und CXCR3 <sup>-/-</sup> Mäuse
Abbildung 28:	Immunhistochemische Analyse der Intimahyperplasie in antikörper- und placebobehandelte Mäuse
Abbildung 29:	Korrelation zwischen Intimahyperplasie und Rekrutierung von CD3 <sup>+</sup> -Zellen in antikörper- und placebobehandelte Mäuse
Abbildung 30:	Immunhistochemische Analyse Reendothelialisierung
Abbildung 31:	Korrelation zwischen Reendothelialisierung und Intimahyperplasie
Abbildung 32:	Immunhistochemische Analyse EMAP-II
Abbildung 33:	Korrelation zwischen EMAP-II und Reendothelialisierung
Abbildung 34:	Immunhistochemische Analyse SDF-1 $\alpha$
Abbildung 35:	Korrelation zwischen SDF-1 $\alpha$ und c-kit <sup>+</sup> -Zellen
Abbildung 36:	Immunhistochemische Analyse TUNEL-Assay
Abbildung 37:	Immunhistochemische Analyse Caspase-3-Färbung
Abbildung 38:	Korrelation zwischen Apoptose und Th1-Immunantwort
Abbildung 39:	Zellkulturstimulationsversuche
Abbildung 40:	Immunhistochemische Analyse p70 S6 Kinase <sup>+</sup>

**10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
µm <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
4E-BPI	eIF-4E binding Protein
A.	Arteria
Ab	Antibody
AK	Antikörper
Anit-IP10/	
anti-MIG pAb	polyklonaler Antikörpercocktail gegen IP10 und MIG
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase
ApoE	Apolipoprotein E
Bp	Basepairs= Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CASMC	Coronary Artery smooth muscle cells, glatte Muskelzellen der Koronararterien
CD	Cluster of differentiation
CD3	Molekül exprimiert auf T-Zellen
CD31	Molekül exprimiert auf Endothelzellen
CD45	Molekül exprimiert auf Leukozyten
cDNA	(Complementary) komplementäre DNA
ckit	Molekül exprimiert auf hämatopoetischen Vorläuferzellen
CXC	zwischen zwei Cysteinen befindet sich eine andere Aminosäure
CXCR3	CXC Chemokinrezeptor-3
CXCR3 <sup>-/-</sup>	CXCR3 Knockout-Maus
CXCR3 <sup>-/+</sup>	CXCR3 Wildtyp-Maus
CXCR4	CXC Chemokinrezeptor-4
d	Tage
d.h.	das heißt
DAB	3,3-Diaminobenzidin

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DCF	Dichlorofluorescein
DES	Drug eluting stent
DNA	Desoxyribonucleic acid
dUTP	desoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase
E.-v.-G.	Elastica-van-Gieson
EC	Endothelial cell, Endothelzellen
EEL	Lamina elastica externa
EF-1 $\alpha$	Elongationsfaktor-1 $\alpha$
ELISA	Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay
ELR	NH <sub>2</sub> -terminale Sequenze Glutamyl-Leucyl-Arginin
EMAP-II	Endothelial monocyte-activating polypeptide-II
FKBP	FK-Binding-Protein
FRAP	FKBP Rapamycin assoziiertes Protein
FST	Fine science tools
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
H <sub>2</sub> O	Wasser
HRP	Horseradish-Peroxidase
HPC	Hematopoietic progenitor cell, hämatopoietische Vorläuferzellen
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
IEL	Lamina elastica interna
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IGF1	Insulin like growth factor 1
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
i.p.	intraperitoneal
IP10	interferon-gamma-inducible-protein 10
KGW	Körpergewicht
LDL	Low density lipoprotein
LSAB	Labeled Strept-Avidin-Biotin-Methode
MAPK	Mitogen-Activated-Protein-Kinase
mg	Milligramm
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

MIG	Monokine induced by interferon gamma
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mTORC1	mammalian Target of Rapamycin Complex 1 = Raptor
mTORC2	mammalian Target of Rapamycin Complex 2 = Rictor
MW	Mittelwert (arithmetisches Mittel)
NADH	reduzierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	reduzierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid- Phosphat
NRS	Normal rabbit serum, Normales Kaninchenserum
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	Signifikanzniveau
pAb	polyclonal Antibody
p70 S6 Kinase	führt zur Phosphorylierung des S6 ribosomalen Protein
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
pH	Potentia hydrogenii
p.i.	post injury
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
Raptor	regulatory associated protein of mTOR
Rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffradikale
rt	Reverse Transkriptase
s.c.	subkutan
SDF-1 $\alpha$	Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$
SEM	Standard Error of the Mean
SMC	Smooth muscle cells, glatte Muskelzellen
Taq	Thermus aquaticus
Tdt	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRAF	TNF receptor-associated factor 4

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

---

TUNEL	Terminal uridine deoxynucleotidyl transferase
USA	United States of America
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Herrn Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl danke ich herzlich für die Übernahme der Arbeit an der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Mein besonderer Dank gilt besonders Frau PD Dr. med. D. Zohlnhöfer für die Überlassung des interessanten Themas und die sehr gute und freundschaftliche Zusammenarbeit bei der praktischen Durchführung der Arbeit sowie die jederzeit gewährte Hilfe bei der Auswertung und Diskussion der Ergebnisse.

Gleichermaßen möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. vet. J. Henke bedanken, für die stets freundliche Unterstützung bei anästhesiologischen und tierspezifischen Fragen.

Für die Bereitstellung der CXCR3 Knockout und Wildtyp Mäuse möchte ich mich recht herzlich bei Herrn PD Dr. med. M. Bek und Herrn Prof. med. H. Pavenstädt bedanken.

Bei Frau R. Hegenlohe bedanke ich mich herzlich für die Beratung bei der Herstellung und Auswertung der histologischen Präparate.

Besonders danken möchte ich den Tierpflegerinnen und Tierpflegern für ihre Hilfsbereitschaft und die verantwortungsvolle Tierpflege.

Weiterhin möchte ich mich bei Ursula Keller, Nicolas Langwieser und Falko Sorge für die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit bedanken.